GOVERNADOR DO ESTADO DE SÃO PAULO
José Maria Marin

SECRETÁRIO DE ESTADO DA SAÚDE
Denir Zamariolli

COORDENADOR DA COORDENADORIA DE SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
Otávio de Azevedo Mercadante

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO, SP — BRASIL
1982

Endereço/Address

Biblioteca do Instituto Butantan
Av. Dr. Vital Brazil, 1.500
Caixa Postal 65
05504 São Paulo, S.P. — *Brasil*

Publicação anual/Annual publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

(*)

MEMÓRIAS do INSTITUTO BUTANTAN. (Secretaria de Estado da Saúde) São Paulo, S.P. — Brasil, 1918-

1918-1980/81, 1-44/45

ISSN 0073-9901
MIBUAH

CDD 614.07205
18

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas especializadas.* São Paulo, Ed. Polígono, 1972.

Serão fornecidas separatas dos trabalhos publicados nas "Memórias do Instituto Butantan", solicitando-se nesse caso o obséquio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Mem. Inst. Butantan
44/45, 1980/81

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. *FINALIDADE*

As MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN são publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores. Têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos da Biologia e da Medicina, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros que se enquadrem no Regulamento dos Trabalhos.

2. *REGULAMENTO DOS TRABALHOS*

2.1 *Normas gerais*

2.1.1 Os trabalhos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à revista "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN".

Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.

2.1.2 *Estrutura do trabalho*

2.1.2.1 *Elementos preliminares*

a) cabeçalho — título do trabalho e nome do autor(es);

b) filiação científica e endereço para correspondência.

2.1.2.2 *Texto*

Sempre que possível deve obedecer à forma convencional do artigo científico:

a) Introdução — Estabelecer com clareza o objetivo do trabalho relacionando-o com outros do mesmo campo e apresentando de forma sucinta a situação que se encontra o problema investigado. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

b) Material e métodos — A descrição dos métodos usados deve limitar-se ao suficiente para possibilitar ao leitor a perfeita compreensão e repetição dos métodos; as técnicas já descritas em outros trabalhos devem ser referidas somente por citação, a menos que tenham sido consideravelmente modificadas.

c) Resultados — Devem ser apresentados com clareza e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado.

d) Discussão — Deve restringir-se à apresentação dos dados obtidos e dos resultados alcançados, relacionando-se novas contribuições aos conhecimentos anteriores. Evitar hipóteses ou generalizações não baseadas nos resultados do trabalho.

e) Conclusões — Devem ser fundamentadas no texto.

Dependendo do assunto do artigo, as divisões acima poderão ser modificadas de acordo com o esquema do trabalho, porém, o artigo deve conter obrigatoriamente:

— Introdução;

— Desenvolvimento do tema (com as divisões a critério do autor);

— Conclusão.

2.1.2.3 *Agradecimentos*

Devem ser mencionados antes das referências bibliográficas.

2.1.2.4 *Material de Referência*

Todo trabalho deve vir obrigatoriamente acompanhado de:

a) Resumos — Um no mesmo idioma do texto, outro em inglês, redigidos pelo(s) próprio(s) autor(es), devendo expressar o conteúdo do artigo, salientando os elementos novos e indicando sua importância. O resumo na língua em que está redigido o trabalho deve ser colocado antes do texto e o em inglês, no final. Só excepcionalmente excederá a 200 palavras. Os títulos dos trabalhos devem ser traduzidos para o inglês e vice-versa.

b) Palavras-chave — Correspondendo a palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo, devem ser em número necessário para a completa descrição do assunto e assinaladas com asteriscos (*) as 3 palavras-chave principais. Para escolha das palavras-chave usar o vocabulário protótipo do campo especializado.

c) Referências bibliográficas — Devem ser incluídas no texto e arranjadas em ordem alfabética do sobrenome do autor, numeradas consecutivamente.

Periódico:

MACHADO, J. C. & SILVEIRA F.º, J. F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:1-9, 1976/77.

Livro:

BIER, O. *Bacteriologia e imunologia.* 18 ed. São Paulo, Melhoramentos, 1977.

As citações no texto devem ser em números-índice correspondendo às respectivas referências bibliográficas.

Exemplos:

As investigações sobre a fauna flebotomínica no Estado de São Paulo, foram feitas em várias ocasiões 1, 3, 4,.................... método derivado de simplificação de armadilha de Disney [2] (1968)...

Referências bibliográficas (correspondentes aos números-índice).

1. BARRETO, M. P. *Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo* (Diptera, Psychodidae). São Paulo, 1943 (Tese — Doutoramento — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

2. DISNEY, R. H. L. Observations on a zoonosis: leishmaniosis in British Honduras. *J. app. Ecol.*, *5*:1-19, 1968.

3. FORATTINI, O. P. Algumas observações sobre a biologia dos Flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, *8*:15-136, 1954.

3. *NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS*

3.1 *Datilografia*

Os originais devem ser datilografados em 3 (três) vias, com espaço duplo, em uma só face, mantendo as margens laterais com aproximadamente 3 cm. Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, no canto superior direito.

3.2 *Tabelas*

Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo seu título. Os dados apresentados em tabelas não devem ser, em geral, repetidos em gráficos. As notas de rodapé das tabelas devem ser restritas ao máximo possível e referidas por asteriscos.

3.3 *Ilustrações*

3.3.1 *Desenhos* e *gráficos*

3.3.1.1 Devem ser feitos com tinta nanquim preta, em papel Schoeller Hammer 3G e 4G. Não usar papel vegetal porque este retrai com o calor e abranda com o frio, e o nanquim tende a ficar mais falhado, devido à porosidade do papel vegetal. Na impressão as ilustrações tendem a ter ligeira deformidade e traços levemente acinzentados, sobretudo os gráficos saem totalmente fora de esquadro.

3.3.1.2 O tamanho, quando ocupar página inteira, deve seguir rigorosamente estas medidas 12,6 x 19,8 cm ou 16,8 x 26,3 cm ou 21 x 33 cm ou 25,2 x 39,6 cm, pois em geral as gráficas com as quais nós trabalhamos, têm um determinado tamanho de letra e as ilustrações precisam ser proporcionais a estes tamanhos existentes. Para uma boa reprodução, não precisa ser maior, pois sendo maior perde muitos detalhes na redução.

3.3.1.3 Aplicar cola no verso do desenho ou do gráfico só na margem superior, numa faixa de aproximadamente 1 cm e colar sobre um cartão um pouco maior.

3.3.1.4 Para melhor proteção, cobrir com papel vegetal de comprimento um pouco maior, de maneira a poder ser dobrado para trás na parte superior e colado.

3.3.2 *Fotografias*

3.3.2.1 Devem ser bem nítidas e contrastadas, pois fotos muito acinzentadas dão péssima impressão.

3.3.2.2 Devem vir soltas dentro de um envelope.

3.3.2.3 Devem ser entregues inteiras e não recortadas, em papel fotográfico liso. O papel fotográfico crespo (martelado) dá péssima reprodução.

3.3.2.4 O tamanho é muito importante. Uma foto para ganhar mais qualidade na impressão necessita sempre sofrer redução. Portanto, mandem fotos sempre de tamanho maior do que o que vai ser impresso. Ex.: para página inteira fotos 18 x 24 cm, para meia página fotos 18 x 12 cm.

3.3.2.5 Colocar um papel vegetal em cima da foto que tiver qualquer anotação a ser feita, ou simplesmente para limitar a parte importante a ser usada. Tomar muito cuidado para não pressionar o lápis ou caneta, a fim de não marcar a foto. Não colocar letras ou números sobre as fotos.

3.3.3 Os textos e números que completam os desenhos, gráficos e fotos devem ser feitos em manuscrito legível ou datilografado (os algarismos sempre em arábicos) direto sobre o papel vegetal que foi colocado para proteção (não pressionar a fim de não marcar as ilustrações) ou em papel branco e colocado no papel vegetal, pois os textos e números serão feitos em tipos gráficos.

3.3.4 A numeração dos desenhos, gráficos e fotos será feita com algarismos arábicos na parte inferior do papel vegetal, não importando se é foto, desenho ou gráfico. Seguir sempre com uma numeração só. Ex.: Um trabalho que tenha 2 fotos, 1 gráfico e 1 desenho seguem com a numeração (fig. 1), (fig. 2), (fig. 3), e (fig. 4), se as 2 fotos vão numa página só, colocar na parte inferior (figs. 1 e 2) e determinar em cima da foto (no papel vegetal) qual é (fig. 1) e qual é (fig. 2). Quanto aos demais elementos necessários à identificação das ilustrações (nome do autor e título do trabalho) devem ser escritos atrás do cartão em que as mesmas estiverem colocadas.

3.3.5 As legendas devem ser apresentadas à parte em folhas datilografadas, constando a numeração correspondente à ilustração. Ex.: Fig. 1 — Legenda.

A Revista admite até 6 clichês (branco e preto) no texto, para cada trabalho, devendo os demais serem pagos pelo autor. Para clichês coloridos deverá haver prévia combinação entre a Comissão Editorial e o autor.

De cada trabalho serão impressas 100 (cem) separatas, devendo o autor pagar as separatas que excedam a esse número, quando solicitar uma quantidade maior. As separatas em excesso devem ser solicitadas quando o manuscrito for encaminhado à Comissão Editorial.

Os trabalhos poderão ser redigidos, além da língua portuguesa, em inglês, francês e espanhol. Outras línguas ficarão a critério da Comissão Editorial.

A reprodução total ou parcial dos trabalhos em outros periódicos — com menção obrigatória da fonte — dependerá de autorização prévia da Comissão Editorial.

Para fins comerciais serão proibidas a tradução e reprodução dos trabalhos publicados pela revista.

Mem. Inst. Butantan
44/45, 1980/81

SUMÁRIO/SUMMARY

Mem. Inst. Butantan
44/45. 1980/81

HOMENAGEM

LINDA NAHAS
1921-1982

Linda Nahas, médica, formada em 1946 pela Escola Paulista de Medicina e Pesquisadora-Científica Nível VI, do Instituto Butantan. Nasceu em São Paulo, aos 10 de fevereiro de 1921 e faleceu em 1.º de março de 1982 em São Paulo.

De 1946 a 1948 estagiou no laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, sob orientação do Dr. Gastão Rosenfeld.

Em 1947 e 48 foi Assistente da Clínica Médica (EPM), Serviço do Prof. Octávio de Carvalho. Em 1948 iniciou suas atividades oficiais no Laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, no qual era estagiária. De 1948 a 1953 foi titular do Serviço de Hematologia do Hospital A. C. Camargo da atual Fundação Antonio Prudente. De 1954 a 1960 chefiou o Laboratório de Citopatologia e Hematologia do Departamento de Patologia, do mesmo Hospital.

Foi bolsista em 1962 e 1963 na Blood Coagulation research Unit, Serviço do Prof. Mac Farlane (Oxford, Inglaterra) e Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Wayne State University (Detroit EUA) Serviço do Prof. W. H. Seegers.

De 1962 a 1966 foi encarregada do Setor de Hematologia da Seção de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

Em 1966 assumiu a chefia da Seção de Fisiopatologia. Colaborou intensamente com as atividades do Hospital Vital Brazil desde 1954. Em 1969, assumiu a Diretoria do Serviço de Fisiopatologia função que ocupou até a sua morte.

Em 1977, integrou a Carreira de Pesquisador Científico Nível VI.

Em 1970, no mês de outubro estagiou no Oxford Haemophilia Centre (Inglaterra), a convite da Dra. R. Biggs.

Participou intensamente nas atividades científicas e de organização de numerosos Congressos e Sociedades científicas. Escreveu ou colaborou em 22 trabalhos científicos originais publicados em revistas especializadas

do Brasil e do exterior sobre envenenamento de serpentes, aranhas, escorpiões e coagulopatias e foi co-autora de capítulo especializado no livro sobre Atualização Terapêutica.

No Instituto Butantan pertenceu aos Conselhos de Pesquisa, de Produção e bem como de várias Bancas examinadoras de ingresso de técnicos superiores e grupos de trabalhos para estudos de natureza técnica.

Participou ainda na formação de numerosos especialistas em Hematologia principalmente no setor da Coagulação sangüínea onde se destacou invulgarmente.

Sua valiosa coleção de livros especializados, foi doada ao Centro de Investigação em Hematologia, sito à Av. Brasil, 633, São Paulo.

A Dra. Linda Nahas foi exemplo de dedicação à carreira médica e de pesquisadora que muito enobreceu o Instituto Butantan.

Mem. Inst. Butantan
44/45:3-10, 1980/81

EDITORIAL

1981. Ano do 80.º aniversário do Instituto Butantan

Jesus Carlos MACHADO

Decidiu a Comissão Editorial das "Memórias do Instituto Butantan", ressaltar neste número, as Comemorações de um evento marcante para a história do Instituto Butantan, qual seja o seu 80.º aniversário, ocorrido aos 23 de fevereiro de 1981.

O Diretor Substituto do Instituto Butantan, Dr. Bruno Soerensen Cardozo — Presidente do Conselho Superior por designação deste, constituiu uma Comissão organizadora, sob a sua presidência e composta por: Dr. Jesus Carlos Machado, Dr. Alphonse Richard Hoge, Dr. Raymond Zelnik, Dr. Henrique Moisés Canter e Dr. Murillo Adelino Soares.

A Comissão organizadora, aprovou o Calendário dos eventos que foram desenvolvidos durante todo ano de 1981 e que foram os seguintes:

— *16 a 20 de fevereiro*
IV Curso sobre Linfomas Malígnos
Coordenador: Dr. Jesus Carlos Machado.

— *23 de fevereiro*
Sessão Solene Comemorativa do 80.º aniversário da Fundação do Instituto Butantan. Carimbo Postal comemorativo do dia da Fundação do Instituto Butantan.

— *23 a 27 de fevereiro*
I.º Encontro Brasileiro de Linfomas Malígnos.
I.º Curso de Reciclagem de Linfomas Malígnos.
IV "Tutorial" sobre Linfomas Malígnos.
Coordenador: Dr. Jesus Carlos Machado.

— *20 a 21 de maio*
Seminário sobre produtos naturais bioativos.
Coordenador: Dr. Raymond Zelnik.

— *11 de junho*
Entrega da restauração do 1.º Laboratório do Instituto Butantan, nele instalando-se o Museu Histórico.
Entrega da recém-instituída "Medalha Instituto Butantan".

— *20 a 24 de julho*
Retrospectiva de filmes de caráter histórico sobre o Instituto Butantan.
Coordenador: Dr. Henrique Moisés Canter.

— *14 de setembro*
Cerimônia do Tombamento do Instituto Butantan.

— *14 a 16 de setembro*
III Congresso Brasileiro de Bioteristas e Entidades Afins.
Presidente: Dr. Bruno Soerensen Cardozo.

— *12 a 23 de outubro*
Curso sobre "Vacinas e Vacinações"
Coordenador: Dr. Bruno Soerensen Cardozo.

— *26 a 28 de outubro*
I Congresso Brasileiro de Vacinas e Soros.
Presidente: Dr. Bruno Soerensen Cardozo.

— *27 de outubro*
Inauguração do Centro de Convivência Infantil.

— *16 a 18 de novembro*
I Simpósio sobre Serpentes e Artrópodes peçonhentos.
Coordenador: Dr. Alphonse Richard Hoge.

Os Congressos, Reuniões Científicas e Cursos contaram para o seu grande êxito, com os auxílios inestimáveis do Conselho Nacional de Pesquisas, do Ministério da Saúde (Divisão Nacional de Doenças Crônicas e Degenerativas, através da Comissão Nacional de Linfomas Malignos e CAIS), da OPAS e das diversas Secretarias de Estado do Governo do Estado de São Paulo.

Cumpre destacar, dentre os eventos a entrega do Museu Histórico. O Diretor do Instituto Butantan, constituiu uma Comissão especial para estudo da localização e efetuar sua implantação. Vamos reproduzir o assinalado no livreto entregue no dia da inauguração e que retrata melhor o que foi idealizado e realizado:

APRESENTAÇÃO

Ao completar o Instituto Butantan, em 1981, 80 anos de existência, dentro dos eventos programados para comemorar esta data, a inauguração do MUSEU HISTÓRICO é um dos pontos altos.

A Diretoria do Instituto Butantan e a Comissão do Museu Histórico decidiram instalar o Museu no primeiro laboratório onde Vital Brazil iniciou rotineiramente seus trabalhos no Instituto Butantan, em 1901. Inicialmente localizou-se o prédio, descobrindo-se seu piso original, alicerce e uma das paredes e, por análise de fotografias e entrevistas com servidores da época, obteve-se a correta disposição do prédio e aspectos de seu interior. Com a colaboração de arquiteto, foi dimensionado corretamente.

Contratou-se especialistas em história e museologia para assessorar a Comissão na instalação e planificação atual e futura do Museu.

A Comissão contou, na estruturação do Museu, com a colaboração inestimável de servidores do Instituto Butantan, que nela se motivaram até emocionalmente.

Ao entregar o Museu Histórico do Instituto Butantan ao público, a Diretoria e a Comissão do Museu desejam mostrar, sobretudo aos jovens, que neste prédio simples, adaptado de um telheiro e de uma cocheira, Vital Brazil produziu o soro e a vacina antipestosa, pesquisou e produziu soros antipeçonhentos, com isso salvando vidas e elevando o nome da ciência brasileira.

Neste local iniciou o Instituto Butantan o seu caminho de aplicação da ciência em prol da saúde pública, há 80 anos.

Em 1888, a criação do Instituto Pasteur, no Rio de Janeiro, representava o início, no Brasil, das pesquisas sistemáticas e aplicações práticas na área da medicina experimental voltada para a saúde pública.

A partir de 1892 eram criados, em São Paulo, o Instituto Bacteriológico, o Laboratório de Análises Químicas, o Instituto Vacinogênico, um Laboratório Farmacêutico e o Desinfetório.

HISTÓRICO

Em 1899, surto de peste bubônica atingia a cidade de Santos; o alastramento da doença, as dificuldades para importação de soros e vacinas para seu tratamento e prevenção, bem como a falta de condições do Instituto Bacteriológico para produzi-los em suas dependências, traria à tona a necessidade de criar-se instituição para combate de doenças epidêmicas na região de São Paulo.

Em decorrência desses fatores, por proposição de Emílio Ribas, diretor do Serviço Sanitário do Estado, foram tomadas as primeiras providências para a criação do "Instituto Serumtherapico", sendo indicado para sua direção Vital Brazil Mineiro da Campanha, médico a serviço do Instituto Bacteriológico.

O então Presidente do Governo do Estado, Cel. Fernando Prestes, designou o Secretário do Interior, Pereira de Queiroz, para que, com Oswaldo Cruz, Adolpho Lutz e Vital Brazil, escolhessem o local para a instalação do novo instituto, mais tarde Instituto Butantan.

O local escolhido foi a Fazenda Butantan, na periferia da cidade, cujas instalações foram adaptadas e aproveitadas. As atividades tiveram início antes da organização oficial do Instituto, que se concretizaria pelo Decreto 878/A, 23-2-1901.

Neste ambiente simples, que exigia grandes sacrifícios dos cientistas, Vital Brazil e seus colegas de trabalho, entre os quais Abdon Petit Carneiro, Dorival de Camargo Penteado, Bruno Rangel Pestana, Carlindo Valeriani, Sergio Meira F.º, Theodureto de Camargo, Francisco Iglesias e muitos outros marcaram com seus esforços e trabalho científico a primeira fase da história do Instituto Butantan.

MACHADO, J. C. Editorial. 1981. Ano do 80.º aniversário do Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:3-10, 1980/81.

Dedicando-se sobretudo à produção de soro antipestoso, Vital Brazil daria também prosseguimento às suas pesquisas sobre ofidismo.

Em 11 de junho de 1901, o Instituto Butantan entregava ao público as primeiras partidas de soro antipestoso e a 14 de agosto do mesmo ano os primeiros soros antipeçonhentos.

O MUSEU

O Museu, tal como chegou até nós, é instituição estruturada na Europa renascentista, a partir das coleções dos grandes príncipes. Durante o período expansionista europeu, o Museu foi usado sobretudo para mostrar à sociedade européia "o novo", "o exótico", "o conquistado" além dos seus limites territoriais.

É só nos fins do século XIX que estudiosos e especialistas em educação passaram a ver o Museu não mais como um gabinete de relíquias mas sim como importante instrumento do processo educacional e da pesquisa científica.

O MUSEU HISTÓRICO do Instituto Butantan propõe-se a ser, através de exposições sempre renovadas a partir de pesquisa sobre seu acervo material e documental, o espelho da trajetória da instituição, desde a sua criação até nossos dias. Não uma sala estanque de um passado recapturado mas sim importante auxiliar para a compreensão dos caminhos da própria atividade científica.

O Instituto Butantan expressa vivos agradecimentos aos servidores que contribuíram no restauro do primeiro laboratório, na recuperação de peças e documentos históricos e outras atividades para a abertura do Museu:

Francisco Capuano, Joaquim Bento da Silva, Francisco Corrêa, Salvador M. Simões, Luiz de Souza, Rodrigo Gil Garcia F.º, Oswaldo Cândido, Milton L. Gonçalves, Francisco P. Belém, Ernesto Gimenez, Ernani da Silva, Milton A. Chagas, Alcides B. dos Santos, Nelson A. de Souza, Waldemar A. de Almeida, Lúcio A. Catani, Joel Braga, Juvenal E. da Silva, José F. Martins, José Felix Irmão, J. Vicente Fernandes, J. Esteves dos Santos, Antonio Fraia, Milton P. da Silva, Antonio Cortez, Oscar S. do Nascimento, Paulo Villela, Antonio B. de Novais, João M. de Godói, Carlos A. Tobias, César F. Figueira, Antonio Ferreira, Benedito A. de Oliveira, José Viter Ribeiro, J. Augusto da Silva, João Lacerda dos Santos, Arlindo A. de Matos, Manoel Rocha, João C. de Morais, Benedito A. da Silva, Luiz C. Prudente, Antonio Jesuino, Arcênio B. de Araújo, Antonio R. Barbosa, Domingos B. de Araújo, Nicolau G. de Lima, Daniel A. Maciel, Januário F. de Andrade, J. Eugênio Máximo, Júlio A. de Azevedo, José da Conceição, Mauro L. de Jesus, Benedito J. dos Santos, Domingos A. Ferreira, Eduardo Conceição, Idalício N. de Melo, João I. Gonzalez, Santo Coelho, Osvaldo Pinto, Israel S. Garcia, Francisco Braga, Juracy A. Chagas, Antonio C. Ribeiro, José F. de Souza, Joel B. de Novais, Irineu Batista, Antonio F. Souza, Orlando Vaine, Lázaro A. de Moraes, Benedito A. de Oliveira, Benedito T. da Silva, Gabriel A. Pinto, Silvio D. de Oliveira, Miguel A. M. Alba, Romeu Simões, Odavilson de Oliveira, Valdelino N. de Souza, Antoninho de Souza, Eliseu Tobias, Floriano da

Rosa, Reinaldo Ramos, J. Carlos Barlleta, Wagner da Rocha, J. Cassiano Borba, Herval J. Ribeiro, Taufic A. Aued.

Na inauguração foi descerrada a placa comemorativa onde está inscrita: Museu Histórico do Instituto Butantan — 1901-1981 (Octogésimo aniversário). Instalado no Laboratório que deu origem aos trabalhos técnicos do Instituto. Eng.º Paulo Salim Maluf (Governador do Estado de São Paulo); Dr. Adib Domingos Jatene (Secretário da Saúde); Dr. Bruno Soerensen Cardozo (Diretor Substituto do Instituto Butantan); Comissão do Museu Histórico: Presidente — Dr. Jesus Carlos Machado; Membros — Dr. Alphonse Richard Hoge, Dr. Newton Pereira Santos, Dr. Henrique Moisés Canter, Iara d'Oliveira Lemenhe, Carmem Aleixo Nascimento. Restaurado pela equipe de funcionários e servidores do Instituto Butantan orientado pelo arquiteto Osmar Antonio Mamini e chefiado por Francisco Capuano, chefe da Seção de Zeladoria. Inaugurado aos 11 de junho de 1981.

Aos 11 de junho de 1981 foi também entregue a Medalha Instituto Butantan, de caráter permanente, pelo Governo do Estado de São Paulo a personalidades e entidades que cooperam com o Instituto Butantan, bem como a Servidores do Instituto que se destacaram nas suas atividades. Foram os seguintes aqueles que meritoriamente a receberam por aprovação unânime do Conselho Superior do Instituto Butantan:

— Dr. Fauze Carlos
Diretor Efetivo do Instituto Butantan
Deputado Estadual — Líder do PDS

— Dr. Antonio Henrique Bittencourt da Cunha Bueno
Secretário da Cultura

— Dr. Leonildo A. Winter
Presidente da Central de Medicamentos

— Alm. Gerson de Sá Pinto Coutinho
Ex-Presidente da Central de Medicamentos

— Dra. Jandyra Planet do Amaral
Ex-Diretora do Instituto Butantan

— Dr. Giuseppe Mauro
Diretor Presidente do Instituto Vital Brazil

— Dr. Roched Abib Seba
Diretor Científico do Instituto Vital Brazil

— Dr. René Corrêa
Ex-Diretor do Serviço de Virologia do Instituto Butantan

— Dr. Oswaldo Vital Brazil
Professor da Universidade de Campinas

— Dr. Alphonse Richard Hoge
Diretor da Divisão de Biologia do Instituto Butantan

— UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
representada pelo Sr. Reitor Dr. Waldyr Muniz Oliva

— CENTRAL DE MEDICAMENTOS
representada pelo Dr. Alex Castaldi Romera

Museu Histórico: Vista interna da parte anterior correspondente ao laboratório.

Museu Histórico: Vista interna da parte posterior correspondente às cocheiras.

Museu Histórico: Vista lateral do museu restaurado e instalado no primeiro laboratório do Instituto Butantan.

— FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS
representada pelo Sr. Maurício Walter Susteras

— FUNDO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
representado pelo Sr. Diretor Científico Dr. Ruy Carlos de Camargo Vieira

— CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO
representado pelo Sr. Presidente Dr. Lynaldo Cavalcanti de Albuquerque

— MINISTÉRIO DO EXÉRCITO — COMANDO DO II EXÉRCITO
representado pelo Sr. Chefe do Estado-Maior, General-de-Brigada Léo Guedes Etchegoyen

— MINISTÉRIO DA AERONÁUTICA — IV COMANDO AÉREO REGIONAL
representado pelo Sr. Comandante Brigadeiro-do-ar João Alberto Correia Neves

— MINISTÉRIO DA MARINHA — COMISSÃO NAVAL EM SÃO PAULO
representado pelo Sr. Presidente Contra-Almirante Milton Ribeiro de Carvalho

— POLÍCIA MILITAR DO ESTADO DE SÃO PAULO
representado pelo Tenente-Coronel Antonio Augusto Neves —
Comandante do 16.º Batalhão Policial Militar

Funcionários do Instituto Butantan

— Sr. Antonio Moreno
— Sr. Jurandyr Soares de Oliveira
— Sr. José Caly
— Sr. Juvenal Bueno Filho
— Sr. Samuel Helfstein Fischer
— Sr. João Domingos Cavalheiro
— Sr. Pedro Vilela
— Sr. Joaquim Cavalheiro
— Sr. Benedito Moreira da Silva
— Sr. Jairo Mendes de Souza

Como se pode observar o 80.º aniversário da Fundação do Instituto Butantan foi condignamente comemorado através de eventos científicos, culturais e principalmente com a recuperação da sua memória histórica representada pela restauração do Museu Histórico, do encontro de cerca de 400 metros lineares de documentação e contratação de dois historiadores para aproveitamento desse material. Com isso a história do Instituto Butantan, instituto pioneiro na implantação da medicina experimental no Brasil, junto a outros que infelizmente foram pouco a pouco desaparecendo ou sendo desfigurados, poderá ser escrita com fidelidade.

Mem. Inst. Butantan
44/45:11-79, 1980/81

CRONOLOGIA DO INSTITUTO BUTANTAN (1888-1981)

1.ª PARTE: 1888-1945

Jandira Lopes de OLIVEIRA *

Da relevância do pioneirismo do Instituto Butantan na implantação das ciências experimentais em São Paulo e a existência de importante acervo: manuscritos de Vital Brazil, relatórios de atividades do Instituto, instrumentos de laboratório, fotografias etc. foram iniciados os trabalhos para a implantação do Museu Histórico, instalado no primitivo laboratório de Vital Brazil, reconstruído a partir das paredes originais.

O Museu Histórico, inaugurado em 11-6-1981, pretende em suas atividades refletir a trajetória do Instituto, desde sua fundação no final do século passado, e para tanto se faz necessário o trabalho sistemático de pesquisas do material documental existente.

Apresentamos agora nosso trabalho inicial, com a realização da cronologia, feita a partir de pesquisas nos relatórios anuais do Instituto. O presente trabalho consiste no primeiro passo para a elaboração da história do Instituto Butantan, seu papel no desenvolvimento das ciências no Brasil e sua inserção na história de São Paulo.

SÉCULO XIX

1888

— Criação do Instituto Pasteur no Rio de Janeiro, marco inicial da Medicina Experimental no Brasil.

1890

— Criação da Farmácia do Estado.

1891

— Organização do Serviço Sanitário do Estado.

1892

— Lei Estadual n.º 43, de 18-7-1892, criava o Laboratório Bacteriológico de São Paulo, o Laboratório de Análises Químicas.

* Museu Histórico do Instituto Butantan.

1893

— Decreto n.º 94, de 28-2-1893 regulamentava o início das atividades do Bacteriológico, sob a orientação do Biólogo francês Felix Le Dantec.

— Adolfo Lutz assumiu a direção do Instituto Bacteriológico.

— Surto epidêmico de cólera na Hospedaria dos Imigrantes foi identificado por Adolfo Lutz.

1894

— Criação do Instituto Vacinogênico para preparar vacina jenneriana; diretor Arnaldo Vieira de Carvalho.

1895

— Epidemia de cólera no Vale do Paraíba.

1897

— Vital Brazil Mineiro da Campanha ingressava como ajudante no Instituto Bacteriológico.

1898

— Adolfo Lutz identificava o "anopheles" (Kertzia cruzi) agente transmissor da malária na Serra de Cubatão.

1899

— Vital Brazil foi enviado a Santos para identificar e pesquisar surto de peste bubônica.

— Adolfo Lutz requisitava material para instalação, nas dependências da Chácara Butantan, deste novo laboratório do Instituto Bacteriológico e Vital Brazil Mineiro da Campanha foi indicado para dirigí-lo; os trabalhos de laboratório foram iniciados a 16 de novembro.

1900

— A Chácara em Butantan possuía "200 e tantos alqueires de terras", 2 casas de moradia, cocheiras, água canalizada e outras pequenas construções, além de boas pastagens e canavial.

— Entre as obras necessárias para o pleno funcionamento do laboratório, foi solicitado o reaproveitamento de um telheiro para instalação do 1.º laboratório provisório; coelheiras, aproveitando as já existentes; construção de gaiolas para cobras; adaptação de um antigo estábulo de vacas para cocheiras de animais imunizados; construção de cocheira-enfermaria; construção de um telheiro para balança e para aparelho de contensão; construção de pequeno pavilhão para sangria de animais; construção de catacumbas impermeáveis para os animais infeccionados mortos; aumento da rede de águas e esgotos; instalação de gás acetileno.

SÉCULO XX

1901

— O decreto 878/A de 23-2-1901 transformava o "laboratório em Butantan" em instituição autônoma com o nome de "Instituto Serumtherapico do Estado de São Paulo". Além de Vital Brazil, o Instituto contava com o seguinte pessoal:

Dr. Abdon Petit Carneiro, ajudante; Horácio Damásio dos Santos, administrador; João Gomide de Castro, escriturário; Tarcísio Magalhães, auxiliar; Vitor Salcedo, João Salcedo, Victor del Franco, André Bumos, José Holi, Francisco Leone como serventes e mais 5 "camaradas" para plantação de forragens e outros serviços.

— Em início de março foi entregue a cocheira-enfermaria construída pelo engenheiro Augusto Fomm.

— O Instituto Serumtherapico entregava as primeiras partidas de soro antipestoso em 11-6 e a 14-8 as primeiras de soro antipeçonhento.

— Vital Brazil solicitava a construção de uma casa para residência do diretor em Butantan e também casas para os serventes. Gastava diariamente uma hora e meia de viagem de "troly" para vir ao trabalho.

— A vacina antipestosa de Maff Kines foi produzida tanto pelo processo primitivo como pelo do Professor Terni, sendo enviados para a Diretoria do Serviço Sanitário 140 tubos de serum. Existiam 6 cavalos para imunização. Em março começou à título de experiência, a imunização em muar.

— Em Sorocaba, Santos e na Capital os resultados da aplicação do serum fabricado em Butantan foram satisfatórios, sendo empregado também em Campos (RJ).

— Foram preparados neste ano 1.636 tubos de serum antiofídico. Por ocasião do início dos trabalhos em Butantan, Vital Brazil já havia desenvolvido estudos sobre envenenamento ofídico e preparado pequenas quantidades de serum para 2 espécies mais abundantes no nosso meio (cascavéis e jararacas). Prosseguiu portanto seu trabalho, já em Butantan, com a imunização de animais para o preparo do serum antibothropico (jararaca) e anticrotálico (cascavel) e urutu; da mistura dos 2 seruns obteve um terceiro, bastante ativo, a que denominou antiofídico.

— Demonstração de provas da ação específica deste serum contra o veneno ofídico foi realizada em 5-11, com a presença do Presidente do Estado, Prefeito Municipal, Secretário do Interior e da Agricultura e outras autoridades. Em 1-12 foi realizada outra demonstração na Escola de Farmácia.

— Além dos seruns citados, eram objetos de estudos os da febre tifóide, o leucotoréico de Metohnikoff e o anti-rábico.

1902

— Dorival de Camargo Penteado substituiu Abdon Petit Guimarães Carneiro, então comissionado em Campos.

— O Instituto contava com 17 animais imunizados contra a peste e sua produção pode atender 3.400 doentes por mês.

— Os soros antibothropico (cascavel), anticrotálico (jararaca) e antiofídico (misto) começaram ter boa procura e foi iniciada campanha de vulgarização destes seruns, sendo realizadas conferências nas escolas Politécnica de São Paulo e de Farmácia.

— As vacinas contra a peste e os seruns fabricados em Butantan eram destinados: ao Hospital de Isolamento de São Paulo, Instituto Bacteriológico do Estado de São Paulo, Diretoria do Serviço Sanitário, Rio de Janeiro, Paraná, Ceará, sendo enviados inclusive para Londres.

— Saíram do Instituto neste ano: serum antipestoso — 1.130 ampolas, serum anticrotálico — 75 ampolas, serum antibothropico — 67 ampolas, serum antiofídico — 475 ampolas, vacina antipestosa — 150 ampolas.

— Vital Brazil recebeu intensa correspondência do interior do Estado descrevendo a eficácia do soro aplicado em pessoas acidentadas com serpentes. Entre outros, cartas do: Conselheiro Antonio Prado, Engenheiro Augusto Fomm, Dr. Olímpio Portugal (Araras), Dr. Marcondes Machado (Tatuí).

1903

— O Butantan prosseguiu na produção de serum e vacina antipestosa e os seruns aplicáveis nos casos de mordedura de cobra. Por não terem sido executadas as obras solicitadas pelo Diretor e indispensáveis para o desenvolvimento técnico do Instituto, não foi possível iniciar o preparo de outros seruns aplicáveis em terapêutica.

— Vital Brazil participou do 5.º Congresso de Medicina e Cirurgia no Rio de Janeiro, apresentando o trabalho "Da serumtherapia no envenenamento ofídico", com demonstração experimental da eficácia do serum anticrotálico.

— Foi dada maior divulgação do soro contra envenenamento ofídico em São Paulo por intermédio de fazendeiros contatados por Vital Brazil.

— O Instituto recebeu 159 cobras entre as espécies: cascavel, jararaca, urutu e jararacuçu.

— Preparou neste ano 2.461 doses do serum antipestoso; 220 serum anticrotálico; 282 serum antibothropico e 1.459 serum antiofídico; 496 das vacinas antipestosas.

— Remeteu seruns e vacinas antipestosas para o Hospital Isolamento de São Paulo, Diretoria do Serviço Sanitário, Comissão Sanitária de Santos, Bahia, tendo enviado também para a Índia e para a Exposição Internacional de São Luiz nos Estados Unidos da América.

— Os seruns contra mordedura de cobra, além da capital paulista e interior do Estado, foram enviados para o Rio de Janeiro, Minas Gerais, Maranhão, Bahia, Ceará, Rio Grande do Sul e USA.

1904

— Em maio, Vital Brazil viajava em visita a Institutos congêneres da Europa, assumindo interinamente a direção do Instituto Serumtherapico, o assistente Dorival de Camargo.

— Foi nomeado também como assistente o Inspetor Sanitário Carlindo Valeriani.

— Não foram efetuadas as obras e reformas solicitadas por Vital Brazil, não se ampliando portanto a produção além daqueles soros e vacinas já referidos nos anos anteriores.

— Foi solicitado ao governo a concessão de transporte gratuito por via férrea das cobras enviadas por fazendeiros do interior, ressaltando-se a importância do recebimento do maior número de cobras para obtenção de veneno para a feitura de soros.

— O Instituto continuava recebendo correspondência com relatos da eficácia do soro contra mordedura de cobras.

— Foram reiteradas as solicitações ao governo quanto às necessidades de melhorias das instalações e pedidos do material para laboratórios, bem como da insuficiência de número do pessoal técnico.

— Foi registrada a entrada de 146 cobras.

— O Butantan cultivava em suas dependências: alfafa, capim fino, couve, cana, milho, uva, trigo e aveia.

— Foram plantados neste ano 230 pinheiros, 370 eucaliptos, 626 mudas de acácias.

1905

— Vital Brazil retornava da viagem à Europa, reassumindo a direção do Instituto.

— Carlindo Valeriani era dispensado e João Gomide de Castro (administrador) pedia exoneração, sendo substituído por Theodureto Leite de Almeida Camargo (engenheiro agrônomo).

— O Instituto continuava a preparar o serum e vacina antipestosa e os seruns antipeçonhentos.

— O serum antidiftérico estava em vias de ser preparado pois já estavam sendo imunizados os animais para tanto.

1906

— Além dos produtos já entregues nos anos anteriores, foi acrescentado o soro antidiftérico. O soro antipestoso tem pouca saída, pela diminuição das manifestações epidêmicas.

— A produção de seruns contra mordedura de cobras foi aumentada: 1905-1.920 tubos de seruns, 1906-3.518 tubos de seruns.

— Vital Brazil incrementava a propaganda junto aos fazendeiros de São Paulo para obtenção de cobras vivas e obtém bons resultados.

— Solicitava ao governo o aumento de funcionários do Instituto, o que tornaria possível o preparo de tuberculina, de serum antitetânico e talvez de serum anticarbunculoso.

— Até então, o Instituto contava além do diretor, um ajudante: Dorival de Camargo Penteado, um administrador: Theodureto Camargo, um escriturário: Henrique da Silva Pinto, dois auxiliares de laboratório: Victor Salcedo e Maurício R. da Silva, um cocheiro, nove serventes e cinco camaradas.

— Os seruns fabricados eram vendidos, trocados ou mesmo distribuídos gratuitamente, além do fornecimento a Diretoria do Serviço Sanitário e outras instituições públicas.

OLIVEIRA, J. L. Cronologia do Instituto Butantan (1888-1981) 1.ª Parte. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*: 11-79, 1980/81.

1907

— Epidemia de varíola no Estado de S. Paulo. A vacina é fabricada desde 1894 pelo Instituto Vacinogênico.

— Início do preparo da tuberculina no Instituto.

— Dorival de Camargo era encarregado do preparo dos seruns antipestoso, antidiftérico e da vacina antipestosa.

— Foi nomeado ajudante em 11-4-1907 o Farmacêutico Bruno Rangel Pestana, trabalhando junto com o Diretor, no preparo dos seruns antipeçonhentos e das tuberculinas.

— Theodureto de Camargo foi nomeado para trabalhar na Escola Politécnica, sendo substituído no cargo de administrador por Jonas M. de Mello.

— Era necessário intensificar e sistematizar a propaganda para remessa de cobras pois era insuficiente o número de cobras para a produção de soros.

1909

— Além do fornecimento em São Paulo, Vital Brazil enviava seruns antipeçonhentos e antidiftéricos para o Uruguai e Argentina, além dos Estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso.

— Distribuição dos serviços:

Dorival de Camargo Penteado: serum e vacina antipestosa, serum diftérico, serum antitetânico (estudos).

Bruno Rangel Pestana: estudos sobre as peçonhas (em colaboração com o diretor) ; preparo dos seruns antiofídico, anticrotálico e antibothrópico; preparo da tuberculina; estudos sobre tuberculose (em colaboração com o diretor) ; estudos sobre hemogregarineas e outros parasitas do sangue.

— Os trabalhos de pesquisa eram publicados na “Revista Médica de São Paulo”.

— Foi conferido ao Instituto Serumtherapico em Butantan a medalha de ouro na Exposição Internacional de Higiene, anexa ao IV Congresso Médico Latino Americano, no Rio de Janeiro.

1910

— O Instituto dava prosseguimento ao fornecimento de seruns e vacinas produzidas nos anos anteriores, aumentando o volume de sua produção. Na área de pesquisas, a continuidade aos estudos sobre tuberculose, não só sobre a biologia do bacilo, mas também do ponto de vista da imunização.

— Em novembro foram iniciadas as obras de construção do novo edifício do Instituto (atualmente o prédio que abriga a Biblioteca e outros setores) sob a direção técnica de Mauro Álvaro, no Governo de Manoel Joaquim de Albuquerque Lins, sendo secretário do Interior, Carlos Guimarães.

1911

— O soro mais procurado era o antiofídico sendo que de 1902 a 1906 foram entregues ao consumo 900 tubos de seruns e de 1907 a 1911, 12.600 tubos.

— Sistematização oficial da permuta de cobras por soros.

— Foi feito o soro antielapíneo (serpentes elaps).

— Início do preparo experimental do serum antitetânico, porém não entregue ao consumo.

— Participação do Instituto Serumtherapico na Exposição Internacional de Higiene em Dresden (Alemanha) sendo representado por Bruno Rangel Pestana, que foi recebido por Dr. Ataliba Florence, que lá se encontrava em estudo. Bruno Rangel Pestana permaneceu na Alemanha se especializando em química biológica.

— João Florêncio Gomes substituiu Rangel Pestana em sua ausência.

— Vital Brazil publicou "Defesa contra o Ofidismo", súmula de todo trabalho realizado até então no Instituto.

1912

— O Instituto prosseguiu na produção dos seruns: antiofídico, anticrotálico, antipestoso, antitetânico (ainda não entregue ao público), da vacina antipestosa, da tuberculina e do soro antidiftérico.

— Os soros mais procurados eram aqueles contra o acidente ofídico, seguido do antidiftérico. A tuberculina era fornecida quase que exclusivamente ao Dispensário Clemente Ferreira.

— Na área de pesquisa os temas principais foram: o estudo dos venenos, toxinas e antitoxinas; biologia das cobras e sua classificação.

— Bruno Rangel Pestana regressava de sua viagem de estudos na Alemanha.

— João Florêncio Gomes era efetivado como ajudante.

— Dorival de Camargo Penteado seguiu para Paris onde trabalhou em histologia patológica no Instituto Pasteur.

— Distribuição dos serviços técnicos:

— Vital Brazil, além do trabalho de direção do Instituto, se ocupou da extração e estudo sobre venenos, estudos sobre a biologia das serpentes e preparo dos seruns antipeçonhentos.

— Dorival de Camargo Penteado: preparo dos seruns antidiftérico, antipestoso, antitetânico e vacina antipestosa.

— Bruno Rangel Pestana: química dos venenos e toxinas, tuberculose e tuberculina.

— João Florêncio Gomes: sistemática das cobras, dosagem dos seruns antipeçonhentos. O Museu ficou sob sua responsabilidade: constava de seu acervo peças anatômicas, cobras nacionais e estrangeiras com 119 espécies, sendo 66 do Brasil. Foram identificadas neste ano 26 espécies de cobras brasileiras.

— O Instituto estabeleceu permutas de serpentes com os Museus de Stutgart, Berlim e Paris.

— As obras do 1.º edifício do Instituto estavam quase concluídas. Em frente ao prédio foi construído o serpentário. Entre outras construções já concluídas se destacavam: 3 casas para empregados, parque em frente do novo edifício, caixas d'água, captação de uma fonte de água, instalação de uma bomba centrífuga, adaptação de um pequeno pavilhão para serviços de observação de pequenos animais inoculados, portão da entrada.

— Em projeto: casas para residência do diretor, para 2 ajudantes e para um auxiliar; cocheira modelo para 50 animais imunizados; e uma caixa para distribuição d'água às máquinas.

— Foi explicitado objetivamente o programa do Instituto Serumtherapico:

a) preparar seruns e vacinas de aplicação prática no nosso meio;

b) estudar todas as questões que se relacionem com a serumtherapia e as demais relacionadas com a saúde pública;

c) divulgação (escrita ou através de conferências) dos resultados das pesquisas originais do Instituto e de noções de higiene.

— Foram projetadas pesquisas para:

a) produção dos seruns anticolérico, antimeningocócico, anti-stafilocócico, antiestreptocócico, antiescorpiônico, seruns aglutinantes diversos, vacina anticarbunculosa etc.;

b) estudos dos assuntos: sistemática e biologia das serpentes do Brasil, estudos sobre as diferentes peçonhas tanto do ponto de vista químico como do toxológico. Serumterapia antipeçonhenta.

— Aracnídios venenosos do Brasil, sua sistemática e biologia. Estudo dos venenos mais importantes desta ordem: serumterapia escorpiônica, histologia patológica destes envenenamentos, insetos sugadores que interessem à higiene.

1913

— Início do funcionamento das novas instalações do prédio do Instituto.

— Os produtos fornecidos pelo Instituto eram: serum antipestoso, vacina antipestosa, serum antidiftérico, serum antiofídico, serum anticrotálico, serum antibotrópico, tuberculina diluída (T.O.A.).

— Dorival de Camargo Penteado retornava de viagem, tendo realizado cursos no Instituto Pasteur de Paris e no Instituto de Moléstias Tropicais de Hamburgo.

— Vital Brazil iniciava imunização de animais para o preparo dos seruns anti-streptocócico e anti-stafilocócico.

— João Florêncio Gomes prosseguiu com o estudo da sistemática das serpentes, descrevendo uma espécie nova venenosa, a qual denominou Lachesis Cotiara. Dedicou-se também ao estudo dos triatomas (barbeiro), da sua distribuição geográfica no Estado e da moléstia que eles podem transmitir.

— O Instituto continuava a ampliar sua coleção de ofídios através de trocas com outras instituições.

— Bruno Rangel Pestana, além de se ocupar com o preparo do serum antidiftérico, da tuberculina e estudos de química de veneno e quimioterapia, realizou estudos sobre protozoologia relativa a moléstia do cão (Nambyuvu).

— Início do programa de conferências com fins de educação sanitária para o povo, tendo sido a 1.ª conferência realizada a 7 de agosto, proferida por João Florêncio Gomes versando sobre a história natural das serpentes.

— Necessidade de ampliar o quadro de funcionários, criando cargos como de mecânico, eletricista, desenhista-fotógrafo, bibliotecário-arquivista e ajudante de 2.ª classe, ou seja, estudantes de Medicina.

— Do preparo técnico do pessoal duas opções eram possíveis: ou contratar especialistas estrangeiros ou enviar brasileiros para estudar nos grandes centros científicos, opção esta escolhida tanto aqui como em Manguinhos no Rio de Janeiro.

— Com aumento da produção houve aumento das despesas, portanto, foi solicitada a verba de 30:000$000 e que a renda dos produtos do Instituto seja aplicada como verba suplementar nas despesas gerais. A renda líquida da verba dos produtos foi de 9:548$450 no ano de 1912.

1914

— Inauguração do prédio do Instituto no dia 4-4-1914.

— Com as novas instalações, início do preparo dos seruns: antidisentérico, antiestreptocócico, antiescorpiônico.

— Dos soros até então fabricados os mais procurados foram: o antiofídico e o antidiftérico.

— Era necessário aumentar o número de animais para imunização para atender à demanda de seruns.

— Vital Brazil partia em viagem de estudos na Europa. Foi substituído por Dorival de Camargo Penteado em sua permanência no exterior no período de abril a outubro; a viagem de Vital Brazil foi prejudicada pela eclosão da 1.ª Guerra Mundial.

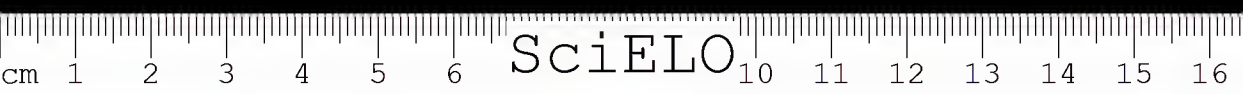
— Distribuição dos serviços técnicos:

Dorival de Camargo Penteado: serum antidiftérico, antipestoso e vacina antipestosa, pesquisas anátomo-histopatológica;

Bruno Rangel Pestana: tuberculina, serum antitetânico, estudos de quimioterapia e de parasitologia;

João Florêncio Gomes: estudo das sistemáticas dos ofídios, biologia das serpentes, dosagem e preparo dos seruns antipeçonhentos, preparo do serum antidisentérico, estudos de parasitologia.

— Na ausência do diretor, o Instituto contou com o auxílio técnico do Dr. Lemos Torres.

— A cargo do Diretor ficou o preparo dos seruns antipeçonhentos, estudo da biologia das serpentes, preparo dos seruns antiestreptocócico e antiestafilocócico.

— A vacina e o serum antipestoso teve sua produção diminuída devido à ausência da moléstia em nosso meio.

1915

— 28-2-1915 — Bruno Rangel Pestana obteve por permuta a transferência para o Instituto Bacteriológico, tendo ocupado seu posto Otávio Veiga.

— Distribuição dos serviços técnicos:

Octávio Veiga — preparo e dosagem do soro antitetânico, da tuberculina e maleína e conservação da coleção de culturas do Instituto, estudo de moléstias parasitárias do cavalo; estudos sobre a lepra e estudos sobre ofidismo;

João Florêncio Gomes — preparo e dosagem dos soros antipeçonhentos, sistemática dos ofídios, tendo descrito 4 novas espécies; o trabalho sobre este tema foi publicado nos Anais Paulista de Medicina e Cirurgia de junho de 1915 sob o título "Contribuição para o conhecimento dos ofídios do Brasil". Ocupou-se também dos estudos de parasitologia. Em colaboração com o Prof. Brumpt estuda nova espécie de Trictoma, o Trictoma Chagasi;

Dorival de Camargo, além de substituir o diretor durante sua ausência, ocupou-se dos serviços de produção de serum antidiftérico, dos estudos de anatomia e histologia patológica e dos ensaios de animais bons produtores de antitoxina.

— Das necessidades do Instituto:

Contratação de mais pessoal técnico; contratação de um técnico para seção de química e outro para organização da seção de parasitologia.

Aumento de verbas do Estado para atingir equilíbrio econômico. Vital Brazil propõe que seja votada uma lei que regularize a venda da produção do Instituto de forma que a renda seja revertida no próprio Instituto. A falta de maiores recursos punha a risco de paralisação das atividades de produção de vacinas e seruns.

Salientava a necessidade de preparar técnicos e cientistas brasileiros no exterior, principalmente nos grandes centros da França e Alemanha, para prover as instituições de pesquisas nacionais, inclusive o Serumterápico.

Tornar o Instituto um centro de difusão da educação sanitária para o povo.

Promover campanha a favor da higiene pública e para tanto orientar os estudos para o combate ao paludismo na luta contra o ankylostomíase, tracoma, moléstia de Chagas, úlcera de Bauru, lepra, difteria, tuberculose, febre tifóide, combater às más condições de higiene, alimentação e habitação do povo.

— Em novembro, Vital Brazil viajava para os Estados Unidos da América, a convite da "Carnegie Endowment for Peace" para assistir o Congresso Científico Pan-Americano, realizado no mês de dezembro em Washington. Vital Brazil apresentou os seguintes trabalhos:

Profilaxia do Ofidismo na América, de Vital Brazil; comunicação sobre o emprego da adrenalina na disenteria amébica, de Theodoro Bayma; nota sobre a profilaxia da febre amarela, de Emílio Ribas; Vital Brazil levou também filmes sobre os trabalhos desenvolvidos no Instituto e uma coleção de ofídios vivos para permuta. Realizou várias visitas a institutos congêneres norte-americanos.

— Da produção do Instituto:

Neste ano apresentou diminuição de 1.000 ampolas de soro antiofídico por perda de animais para imunização.

O soro antiescorpiônico não é entregue ao consumo por falta de veneno em quantidades suficientes para fabricação de antígeno.

Houve muita procura do soro antidiftérico sendo entregue ao consumo 3.200 ampolas.

São entregues ao consumo 1.000 ampolas de soro antitetânico.

Tiveram pouca procura o serum e vacina antipestosa, a maleína e a tuberculina.

Estavam em vias de preparação para consumo os soros antiescorpiônico, antidisentérico e antitífico.

1916

— Distribuição dos serviços técnicos:

Dorival de Camargo Penteado — serviço de peste e difteria; estudos de anatomia e histologia patológica.

João Florêncio Gomes — preparo dos soros antipeçonhentos e antidisentérico, estudo da sistemática e distribuição geográfica dos ofídios; distribuição geográfica dos triatomas em São Paulo e estudos sobre a transmissão do germen do Nambyuvu; prosseguiu nas experiências para determinar as condições em que se deve ser instituído o tratamento específico do ofidismo.

Octávio Veiga preparo dos soros: antitetânico, tuberculina e maleína; estudos sobre a strongylose (verminose) dos eqüídeos e sobre diversas epizootias. Representou o Instituto na Conferência Sanitária realizada em Buenos Aires, apresentando dois trabalhos: sobre a Strongylose dos eqüídeos e outro sobre a mosca doméstica.

Vital Brazil, além da direção do Instituto, se incumbiu do preparo do soro antistreptocócico, a concentração dos soros antitóxicos e estudos de sorologia.

Houve substancial aumento da produção de soro antidiftérico, dada a grande procura, devido a escassez do produto estrangeiro no mercado (período da guerra). O Butantan conseguiu produzir 6.947 ampolas do produto, tendo no ano anterior produzido 3.200; conseguiu também resultados melhores com soro mais ativo.

Com vistas a difundir os produtos do Instituto e aumentar suas vendas o diretor sugere que seja entregue à uma casa comercial, a representação comercial do estabelecimento.

— Produção do Instituto Serumterápico:

Soros antitetânicos 1.867 ampolas.

Soros antipeçonhentos 9.500 ampolas.

Soro e vacina antipestosa: manutenção do estoque.

Soro antidisentérico já entregue ao consumo.

Soro antiestreptocócico em vias de preparo.

Soro antiescorpiônico; apesar de em 1907 ter sido iniciada a imunização de animais não foi possível sua fabricação para atender o consumo, devido a não-obtenção de venenos suficientes. Este ano foi reiniciada sua produção.

Soro hormônico: ação do soro normal de cavalos no tratamento da epilepsia (resultados não conclusivos) através de pesquisas realizadas por Vital Brazil e Felippe Aché. Da decomposição do soro normal se chegou ao soro hormônico ou soro tônico-estimulante usado a título de ensaio no Hospício de Juqueri.

Tuberculina.

Maleína: fornecida à Força Pública e à Câmara Municipal.

Parte dos produtos foi comercializada, sendo seu rendimento bruto da ordem de 91:222$400.

1917

— Foram criados os serviços de Botânica e Química, a instalação do Horto Oswaldo Cruz de cultura de plantas tóxicas e medicinais, o laboratório de Opoterapia e o de Soluções Medicamentosas.

— Foram feitas algumas melhorias nas instalações como a construção de 2 pavilhões, aquisição de maquinários, câmaras frigoríficas para apoio dos serviços de laboratório. Foram instaladas uma oficina mecânica, uma carpintaria e marcenaria.

— Concorrência para a comercialização dos produtos do Instituto tendo concorrido duas firmas: Casa Fretin e Armbrust e Cia. Ganha a Armbrust, que firma contrato com o Governo do Estado em 21-5. Ficava estabelecido por 5 anos que a Armbrust seria a única depositária dos produtos do Instituto com desconto mínimo de 40% e máximo de 50%, conforme o volume de compras realizadas. Ficou ainda estabelecido o mínimo de compras de 10 contos de réis mensais e a quantia de 60 contos, como adiantamento da firma ao Instituto, quantia essa a ser amortizada no prazo de 5 anos.

— À casa Armbrust cabia a propaganda dos produtos do Instituto e auxílio pecuniário para as publicações de trabalhos científicos.

— Aumento do pessoal técnico:

Dr. F. Hochne, Joaquim Crissiuma e Toledo, Francisco de Camargo Mesquita, Juvenal de Lima, Artur Pedroso, Benedito Laurindo de Morais; Afrânio do Amaral e Paulo de Araújo (17-8).

— Comissões: João Florêncio Gomes realizou três excursões científicas pelo interior do estado junto com Diretor Geral do Serviço Sanitário;

Octávio da Veiga viajou para Pelotas a fim de verificar as condições para instalação de uma filial do Instituto; viagem para Argentina para efetuar compra de cavalos.

— Distribuição dos serviços técnicos:

Dorival de Camargo Penteado — serviço de difteria e peste, exames anatomopatológicos; estudos histológicos sobre as glândulas da cabeça dos ofídios.

João Florêncio Gomes — preparo dos soros antipeçonhentos, preparo do soro antidisentérico, estudo da sistemática e biologia das serpentes. Estudos sobre o tratamento dos acidentes ofídicos pelos soros específicos e em colaboração com o Diretor Geral do Serviço Sanitário.

Artur Neiva — estudo sobre a evolução do berne e os mecanismos de sua propagação.

Octávio Veiga — preparo do soro antitetânico, da tuberculina, maleína e piocianase; trabalhos de veterinária, com a inspeção geral dos animais do Instituto; início da imunização de animais para produção do serum antitifóidico.

Vital Brazil — preparo do soro antiestreptocócico, soro antiescorpiônico e a concentração de diferentes soros.

— Aumento dos produtos do Instituto:

Soros: antiofídico, anticrotálico, antibotrópico — (João Florêncio Gomes).

Soros antidiftérico e vacina e soro antipestoso — (Dorival de Camargo Penteado).

Soro antitetânico — (Octávio Veiga e Joaquim Crissiuma).

Soro antidisentérico — (João Florêncio Gomes e Octávio Veiga).

Soro renal caprino — (João Florêncio Gomes e Afrânio do Amaral).

Soro antitóxico gravídico (Afrânio do Amaral).

Soro antiestreptocócico, antiescorpiônico, soro hemostático (coagulante), normal de cavalos (Vital Brazil).

Soluções medicamentosas (Paulo de Araújo): soro fisiológico, solução de tártaro emético, solução de Iodureto de sódio, by-cloridrato de quinina, chlorhydro sulfato de quinina, chlorhydrato de morfina e de entina; sulfato de sparteina, de cafeína, de cânfora. Suspensão oleosa: calomelanos, solução de cacodilato de sódio, solução gauche, solução do sonligoux, solução neuro-Tônica, vacina antipestosa, piocianase, tuberculina in natura, tuberculina (T.O.A.), tuberculina de Koch.

— Necessidade do Instituto:

Aumento de n.º de animais p/ imunização.

Aumento da pastagem e adubação do solo.

Construção de casas p/ residência do funcionário, desdobramento da escola mista, que funcionou no antigo laboratório provisório para duas escolas c/ separação de sexo.

Criação de biblioteca especializada e publicação de revista especializada.

Solicitação de leitos na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, para que se faça o acompanhamento de verificação de terapêutica dos produtos fabricados no Instituto.

— Houve aumento das despesas devido às ampliações efetuadas no Instituto, apresentando neste ano, déficit em seu orçamento.

— A municipalidade concedeu medalha e diploma comemorativo ao Instituto Serumtherapico na 1.ª Exposição Industrial da Cidade de São Paulo.

— Reforma do Serviço Sanitário.

1918

— A estrutura funcional do Instituto se ampliava pela reforma que sofreu (Decreto 1596 de 29-12-1917) criando 18 cargos novos:

Um assistente, quatro subassistentes, um botânico, um químico, um desenhista ceroplasta, um chefe de cultura, um mecânico eletricista, um chefe cocheira, um bibliotecário, um fotógrafo micrografista, um encadernador, dois escriturários, um motorista, um porteiro telefonista, um guarda noturno.

— Distribuição dos serviços técnicos:

Dorival de Camargo Penteado — serviço de difteria, peste, exames histopatológicos.

João Florêncio Gomes — sistemática de ofídios, soros antipeçonhentos, soro antidisentérico, trabalhando em conjunto com Arlindo de Assis, preparou a 1.ª partida de vacina gonocócica e realizou estudos sobre a gripe.

Joaquim Toledo Crissiuma — estudos sobre o tétano, soro antitetânico, estudos sobre a tuberculose, preparo da tuberculina, maleína.

Octávio Veiga — trabalhos de veterinário, estudo do grupo colli tífico.

Afrânio do Amaral — opoterapia, sangrias, trabalhos hospitalares e fiscalização de produtos, assistência médica aos funcionários.

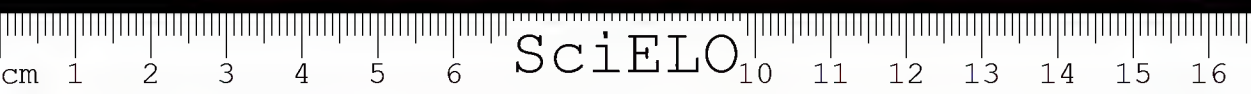
Paulo de Araújo — soro e vacina antiestreptocócica, soluções medicamentosas.

Arlindo de Assis — vacina antiestafilocócica, vacina antigonocócica, exames de produtos.

F.C. Hoehne — estudos de botânica, tendo a seu cargo o Horto Oswaldo Cruz (1700 espécies classificadas) e a estação biológica do alto da Serra (reserva florestal).

— Pesquisas Científicas:

Dorival de Camargo Penteado — além do prosseguimento de estudos iniciados anteriormente, ocupou-se da pesquisa sobre a difteria.

João Florêncio Gomes — sistemática de ofídios, tendo examinado as coleções do Museu Paulista, Museu do Pará e do Ceará; escreveu dois

artigos, publicados na revista do Museu Paulista e nas Memórias do Instituto Butantan: Estudos de sorologia e microbiologia; Estudos sobre disenteria bacilar; sobre as condições culturais do gonococo e sobre diferentes germes isolados em casos de gripe, tendo trabalhado em colaboração com Arlindo de Assis e obtido uma vacina combinada com bons resultados.

Paulo Araujo — experiências para determinar a atividade relativa dos soros normais de diferentes espécies como preventivo na infecção carbunculosa a título experimental.

Florêncio Gomes — estudos sobre soros precipitantes; modificações na ação ativante hemolítica durante o período de imunização.

Afrânio do Amaral — observações clínicas e terapêuticas colhidas na enfermaria do Butantan na Santa Casa. Demonstrou o poder cicatrizante do soro seco e ensaio de outros produtos (soro normal, soro antipneumocócico).

F. C. Hoehne, os estudos de botânica.

— Produção Industrial do Instituto:

Soro antipeçonhento, soro antidiftérico, soro antitetânico, soro antiestreptocócico, soro antidisentérico, soro antipestoso, soro antitóxico gravídico, soro antipneumocócico, soro normal de cavalo, soro normal de boi, hemostático, vacinas bacterianas diversas, tuberculina, maleína, óleo canforado, soluções medicamentosas, extratos orgânicos injetáveis, extratos orgânicos por via gástrica, comprimidos de órgãos.

O Dr. Octávio Veiga esteve em comissão na cidade de Pelotas, dirigindo a instalação da filial do Instituto Butantan. A nova instituição tem produzido a vacina jenneriana, feito o tratamento anti-rábico, recolhido peçonhas de serpentes para permuta com soro do Butantan e realizado todos os exames bacteriológicos e bacterioscópicos da região; Dr. Costa Pereira seria confirmado como diretor desta repartição.

— Octávio Veiga também representou o Instituto Butantan na Conferência de Higiene realizada no Rio de Janeiro.

— Foi criado o Instituto de Veterinária com pessoal subordinado administrativamente à seção da Indústria Pastoril da Secretaria da Agricultura, mas com a orientação científica do Instituto Serumterápico.

— Vital Brazil foi contrário ao estabelecimento do Instituto de Veterinária com essa organização.

— Por incumbência do Inspetor Geral da Instrução Pública do Estado, o Instituto Serumtherapico organizava curso elementar de higiene para inspetores escolares.

— João Florêncio Gomes morreu em 13-6-1918, interrompendo carreira científica brilhante.

— Foi publicado o 1.º volume das "Memórias do Instituto Butantan" e "Coletânea de trabalhos científicos" de 1901 a 1917.

— Economia — Apesar da grande produção, a despesa ultrapassou a receita, o que para tanto contribuiu a elevação do preço dos materiais empregados na indústria, as despesas com a criação de novos serviços e

as condições onerosas do contrato com a Casa Armbrust e o mal cumprimento do referido contrato. A firma, sem assumir os riscos da produção, ficava com a maior parte dos rendimentos.

1919

— Devido a desentendimentos relacionados com a orientação do Serviço Sanitário do Estado de São Paulo, Vital Brazil retirou-se do Instituto e foi para Niterói (Rio de Janeiro) onde fundou o Instituto Vital Brazil. Foi acompanhado pelos assistentes: Dorival de Camargo Penteado, Octávio Veiga, Arlindo de Assis e ainda Crissiuma de Toledo.

— Em 11-7 Antonio Joaquim Ulhôa Cintra assumiu a direção interina do Butantan, depois respondendo pela direção, Artur Neiva, diretor para produção de soros.

— O Instituto apresentou um déficit de 88:476$270.

— O contrato com a Casa Armbrust e Comp. prejudicou a expansão comercial do Instituto e conseqüentemente o desenvolvimento científico. Porcentagem de lucro da firma muito grande (40% da renda bruta) e 10% de bonificação, quando da venda anual mínima de 150.000$000.

— Saída de Vital Brazil e parte do pessoal técnico, desorganizando os serviços e atrasando a produção.

— Falta de cobras e conseqüentemente de venenos, matéria-prima para produção de soros.

— Necessidade de inutilizar produtos por falta de condições de consumo e dificuldade em repor tais produtos.

— Falta de milho e capim o que levou o Instituto despender grande verba para compra de ração para os animais.

— Lemos Monteiro que trabalhava no Instituto Bacteriológico desde 5 de julho foi removido para o Butantan em 18-7-1919.

— O desenhista ceroplasta Augusto Esteves pediu exoneração.

— Todo assunto referente a ofidismo ficaria a cargo de Afrânio do Amaral que parte para o interior a fim de contatar os melhores fornecedores de serpentes. Acumulou diversos serviços: opoterapia; ofidismo, concentração e dosagem dos diferentes soros, sangrias de animais estabulados.

— Aumento do pessoal técnico: José Lemos Monteiro da Silva, Joaquim Pires Fleury e José Bernadino Arantes.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

J. B. Arantes — soro antidiftérico, antipestoso e estudos de anatomia patológica.

Afrânio do Amaral — ofidismo, opoterapia, soro antidisentérico, e concentração de soros.

José Lemos Monteiro da Silva — soro antitetânico, tuberculinas, maleína, soluções medicamentosas e verificação da esterialidade de diversos produtos.

J. Pires Fleury — soro antiestreptocócico e antipneumocócico.

Artur Neiva (diretor) — vacinas, orientação e fiscalização de todos os serviços.

— Devido à conjuntura de crise interna, o serviço hospitalar realizado pelo Butantan na Santa Casa de Misericórdia foi suspenso.

— Acusações de Afrânio do Amaral à administração de Vital Brazil (desaparecimento de venenos secos, não cumprimento da permuta de cobras por soros).

— Pelo decreto n.º 1.700 de 26-12 foi criado o Instituto de Medicamentos Oficiais em Butantan, que ficaria a cargo do químico Alfredo de Araújo Lima.

1920

— Crise do Instituto: dívida de 106:586$800 da administração anterior, falta de verbas, baixos vencimentos do pessoal técnico.

— Afrânio do Amaral foi encarregado de responder pela Direção do Instituto Serumtherapico.

— O subassistente Lucas de Assumpção foi nomeado em 17-3 e a partir de outubro, ficou encarregado da seção de opoterapia.

— Afrânio do Amaral realizou trabalhos de terapêutica: preparo de soro eumênico, usados pelos clínicos Celestino Bourroul e Vieira Marcondes e de um preparado de extrato pluriglandular para tratamento de asma essencial.

— Distribuição dos serviços técnicos:

J. B. Arantes continuou a preparar o soro antidiftérico, soro e vacina antipestosa e piocianase, estudos de anatomia e histologia patológica.

J. P. Fleury — preparo dos soros e vacinas estreptocócicas e penumocócicas; preparo de soro antimeningocócico polivalente.

J. Lemos Monteiro realizou várias experiências para obter um método prático de imunização antitetânica e outros trabalhos referentes ao preparo da tuberculina e maleína, serviços de soluções medicamentosas e verificação de produtos injetáveis.

F. C. Hoehne, serviços de Botânica.

Afrânio do Amaral, além da direção do Instituto, se ocupou de todos os demais serviços médicos, seção de opoterapia, seção de ofidiologia, preparo dos soros antipeçonhentos, antiescorpiônico, serviços de disenteria bacilar e da superintendência geral dos trabalhos de sangria e concentração de soros.

— Intensificação de intercâmbio científico com outros institutos congêneres no país e no exterior.

— Realização do 3.º curso de higiene para professores da rede estadual de ensino.

— Aumento do cultivo de pastagem.

— Obras de reparo e início da construção da Escola Rural.

— Pedido de envio de cascavéis da Bahia para o Butantan.

— Superou o Instituto seu déficit, terminando o ano com 82:528$900 em caixa.

— O Instituto foi premiado com medalha de ouro na Segunda Exposição Industrial da Cidade de São Paulo.

— Foi quebrada a praxe de troca de soro por cobras que até então existia, passando a serem pagas, em dinheiro, aos fornecedores.

— Até esse ano o Instituto Serumtherapico funcionava sem uma organização definitiva.

1921

— Até 6 de setembro o cargo de diretor foi ocupado por Afrânio do Amaral.

— Animais para imunização foram fornecidos pelo Regimento da Cavalaria de São Paulo mediante acordo entre as Secretarias da Justiça e do Interior, representando economia para Butantan na compra de animais.

— Redução das despesas, aumento da produção estabilizando gradualmente as finanças do Instituto.

— Incremento da seção agrícola com a instalação de oficina mecânica, de ferreiro, seleiro, máquinas agrícolas.

— Implantado sistema de semi-entabulação de animais com economia de gastos com rações.

— Inaugurado prédio da Escola Rural.

— Reforma de 8 casas de funcionários.

— Instalação da rede de esgoto.

— Necessidade de reformulação do sistema elétrico.

— O químico Alfredo de Araújo Lima, designado para Instituto de Medicamentos Oficiais, se transferiu para o Laboratório de Análises.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

Lucas de Assumpção — seção de opoterapia e serviços anexos de sangria de cabras e ovelhas.

José Maria Gomes — preparo das soluções medicamentosas, estudos de cogumelos patogênicos e disenteria bacilar.

J. P. Fleury investigações sobre coccos e preparo de vacinas e soros meningococos, estreptococos e gonococos.

Quando em comissão na Bahia, Afrânio do Amaral instalou o posto antiofídico anexo à Faculdade de Medicina.

O assistente J. B. Arantes — pesquisas sobre hemogregarinas de cobras e estudos sobre métodos de imunização para antitoxinas diftéricas; preparo dos soros antipestoso e antidiftérico.

Lemos Monteiro — fiscalização dos produtos a serem entregues ao consumo, imunização para antitoxina tetânica e a preparação de maleína e tuberculina.

Fernando Paes de Barros — encarregado do Instituto de Medicamentos Oficiais; apesar da pouca disponibilidade de verbas, prosseguiu na pesquisa de vegetais e na produção de água destilada.

O botânico F. C. Hoehne — excursões de colheita de material, catalogação de material e publicação de dois trabalhos científicos.

Afrânio do Amaral — serviços de ofiologia, de concentração de soros; publicou sete trabalhos. Os assistentes do Instituto pesquisaram e atenderam a epizootia de peste bovina irrompida nas imediações de São Paulo.

— A transferência do cargo do Diretor para Rudolph Kraus em 6-9. Este novo diretor explicitou a necessidade de reorganização do Instituto:

Péssima situação financeira, falta de uma contadoria organizada.

O contrato com a Casa Armbrust e Comp. terminou no mês de maio de 1922, não devendo ser renovado.

A necessidade de organização de forma que a renda da venda dos produtos seja revertida no próprio Instituto de forma a equilibrar as despesas, sem que seja mantido o rígido esquema de poupança, que prejudicou o desenvolvimento do Instituto.

Necessidade de aumentar o número dos cavalos para imunização, aumentando conseqüentemente a produção de soros.

— Rudolph Kraus iniciou a produção de vacina antitífica, antes preparada no Instituto Bacteriológico. Esta vacina sendo gratuita, portanto, onerava o Instituto.

— Foi iniciado o preparo do soro antigangrenoso.

— Teófilo Martins e Augusto Hencke (veterinários) foram encarregados do serviço de imunização de cavalos.

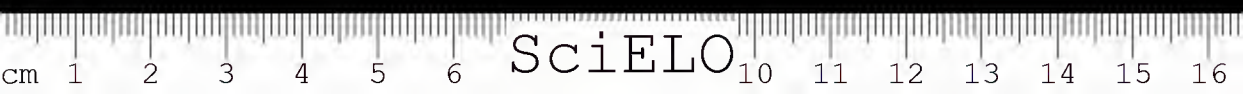
— A seção de concentração de soros se transferiria para junto da seção de envasamento e acondicionamento dos produtos, reunindo, portanto, todas as seções de preparo de soros.

— Necessidade de reaparelhamento do Instituto e reparos nos prédios.

— Solicitação de reconhecimento, pelo Governo, da Caixa Beneficente dos Empregados do Instituto e aumento de salários dos funcionários.

— Da necessidade de fabricar somente "produtos já conhecidos pela ciência" e na programação de novos produtos estão: vacina anticarbunculosa para uso veterinário, tuberculina Denys, leite para proteinotherapia, vacina para lepra, soro antitetânico e antidiftérico de bovinos, AT. de Behring. Para o diagnóstico biológico, soros precipitantes, hemolisinas, autovacinas etc.

— Seção de opoterapia: necessita ser reorganizada e ser contratado um técnico químico-biológico experimental. O diretor Kraus não queria preparar produtos que não tivessem base científica.

— Rudolph Kraus dividiu o Instituto em seções de forma a promover os assistentes a chefe de serviço e titulares, os atuais subassistentes, aumentando os vencimentos de todos.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

Seção de ofiologia — Afrânio do Amaral; seção de toxinas e dosagem de soros — J. B. Arantes; seção de vacinas — J. P. Fleury; seção de peste, preparo de tuberculina, maleína e vacina anticarbunculosa — Lemos Monteiro; seção de microbiologia — José Maria Gomes; seção de diagnóstico biológico — Lucas de Assumpção; seção de opoterapia-farmacêutico — F. Paes de Barros.

— O Instituto de Medicamentos Oficiais estava fechado.

— O pessoal técnico foi aumentado com a contratação de dois sub-assistentes: Paulo Marrey trabalhando com J. B. Arantes e Rocha Botelho junto de Afrânio do Amaral.

— A necessidade de os assistentes disporem de tempo maior para pesquisa, daí a necessidade de o Instituto dispor de número maior de técnicos para fabricação de soros e vacinas.

— Solicitou mais verbas para Biblioteca.

— Rudolph Kraus organizou conferências semanais entre os técnicos para divulgação de artigos científicos; curso de Microbiologia para os novos assistentes e para aperfeiçoamento dos médicos, conferências sobre enfermidades infecciosas, sua profilaxia, vacinação e tratamento. Esses cursos seriam programados análogos àqueles do Instituto Pasteur e Instituto Koch.

— Rudolph Kraus propôs a fundação de uma Sociedade de Biologia, que depois de implantada foi presidida por Adolpho Lindenberg.

— Organizou também conferências populares para divulgação científica sobre as enfermidades infecciosas para o público em geral.

— Kraus tencionava modificar o Museu do Instituto, até então sobre cobras, ampliando-o para Museu de Higiene.

— Pesquisas em andamento:

Afrânio do Amaral — sistemática das serpentes.

J. B. Arantes — estudos sobre estado filtrável dos protozoários, sobre os métodos de imunização em cavalos depois do descanso.

J. P. Fleury — estudo dos tipos de meningococos e pneumococos.

José Maria Gomes — estudos dos fungos e das blastomicis e da cultura de "Peptospira icteróides".

Lucas de Assumpção — preparo de antígenos e soros hemolíticos para reações biológicas da sífilis, estudo sobre tuberculose e lepra.

Paulo Marrey — bacteriologia d'Herelli.

C. Hohne — sistemática de plantas.

— Projeto de ampliação das seções criando as de: protozoologia, entomologia, parasitologia e química biológica experimental e para tanto se deveria contratar especialistas europeus, com contratos de dois anos.

1922

— Foram reiteradas as solicitações do ano anterior ao Governo do Estado para plena execução do plano administrativo de Rudolph Kraus:

ênfase à necessidade da venda dos produtos ser organizada de forma comercial para que possa fornecer verbas necessárias e equilibrar as despesas — o Instituto estava em déficit desde 1918.

— Afrânio do Amaral estava de licença, tendo viajado para os Estados Unidos.

— J. P. Fleury se transferiu para o Instituto Bacteriológico.

— A redução do pessoal técnico prejudicando o desenvolvimento dos trabalhos, agravado também pelos baixos salários pagos aos funcionários, más condições das moradias dos funcionários.

— Necessidade de novas construções e reparo nos serpentários e jardins; medidas para resolver o problema de transporte até o Instituto.

— Solicita apoio moral e material do Governo e justificou sua linha de ação baseada na experiência em Institutos do exterior, ressaltando, no programa, os objetivos do Instituto: fabricante de produtos para defesa da Saúde Pública e de ser um centro de ciência, atualizado com o desenvolvimento das ciências e produzindo também trabalhos teóricos originais, voltados à ciência aplicada.

— A necessidade de formar técnicos sorólogos com conhecimentos de microbiologia.

— As conferências semanais no Instituto foram suspensas por ordem superior.

— Os trabalhos científicos publicados no Instituto neste ano eram relacionados com a sorologia.

— O Instituto de Medicamentos Oficiais foi anexado a nova seção de Organoterapia.

— A seção de Botânica (horto Oswaldo Cruz) foi incorporada ao Museu Paulista, sem ter sido consultado o diretor R. Kraus.

— Distribuição dos serviços técnicos:

Seção de ofiologia: Rocha Botelho substituindo Afrânio do Amaral; pouca produção de soros por falta de cavalos para imunização.

Seção de peste: Lemos Monteiro.

Seção de toxinas e dosagem de soros (difteria, tétano, disenteria) Paulo Marrey.

Seção de vacinas: Lucas de Assumpção, substituído depois por José Maria Gomes.

Seção de soros antiinfecciosos: com a transferência de Fleury para o Bacteriológico, a seção ficou a cargo de Lucas de Assumpção.

Seção de microbiologia: José Maria Gomes.

Seção de concentração de soros: Victor Salcedo.

Seção de imunização: Artur Teófilo Martins; Augusto Hencke, veterinário contratado, foi despedido por ordens superiores, sendo substituído por veterinário da Força Pública.

Seção de sangria — José Salcedo.

Administração — Julião Joaquim de Freitas.

— Biblioteca:

Seção de desenho — Carlos Rodolph Fisher e auxiliar H. Chiarelli.

Seção de fotografia — Euclides Soares.

Seção de meios de cultura subdividida em:

a) esterilização de material infectado dos laboratórios;

b) feitura dos meios de cultura.

Encarregado: Antonio Alvarenga — coelheira.

Agrícola: Serafim Fontes.

Mecânica: João Nicacio Godói.

Seção de permuta de serpentes.

1923

— Rudolph Kraus em 9-7 solicitou ao Governo a rescisão do seu contrato. Assumiu a direção do Instituto Serumterápico J. Bernardino Arantes (Lemos Monteiro assinou relatório).

— O relatório anual se resumiu no fornecimento de dados referentes à produção de soros e vacinas.

— Morreram 59 cavalos.

— Críticas ao trabalho de Kraus: número de cavalos excessivo e fracos para imunização.

— Rudolph Kraus publicou "Noções Gerais sobre Cobras".

1924

— Em setembro de 1924, Vital Brazil voltou à direção do Instituto Serumtherápico convidado pelo Governo do Estado (Carlos de Campos) com contrato de quatro anos.

— Vital Brazil relatou, nesse relatório, os motivos de sua demissão em 1919: sua oposição à política do Governo em transformar o Instituto em "fábrica de soros, vacinas, outros produtos biológicos e solutos medicamentosos com preocupação industrial da concorrência a outras fábricas" o que, para tanto, foi realizado pelo Governo contrato comercial com a Casa Armbrust, muito oneroso para o Instituto. "Além desse erro, de gravíssimas conseqüências para o futuro do estabelecimento, outro, de não menos alcance, era cometido à revelia da vontade e do parecer de quem até aquela data havia guiado com certa liberdade os destinos da instituição. Refiro-me à criação do Instituto de Veterinária, subordinado à direção da Indústria Pastoril da Secretaria da Agricultura, instalado nos terrenos de Butantan e com orientação científica do diretor deste estabelecimento." Da dissociação da direção do Instituto e da inconveniência de se instalar uma clínica de animais doentes junto a cocheiras e pastagens de animais destinados à produção de soros terapêuticos residiu a oposição de Vital Brazil.

— O Instituto de Quinina Oficial instalado com grande dispêndios, com máquinas, aparelhos e pessoal técnico depois não podendo funcionar por falta de matéria-prima, sendo então transformado em Instituto de Medicamentos Oficiais, também inoperante.

— O contrato com a Casa Armbrust terminou, não concretizando a transformação de Butantan em indústria, o Instituto de Veterinária foi transferido e do Instituto de Medicamentos Oficiais só restou o edifício.

— As direções interinas não seguiram a linha administrativa anterior, a atuação do Prof. Kraus foi conflituosa com os assistentes e a crise se estabeleceu no Instituto, levando mesmo o governo quase a fechar o estabelecimento.

— Foi necessário dispensar "elementos perturbadores irredutíveis da boa ordem" e admissão de novos elementos.

— A distribuição dos serviços técnicos ficou assim:

José Bernardino Arantes: organização dos serviços de protozoologia.

Lemos Monteiro: serviços de tétano e difteria.

Paulo Marrey: serviços de peste, disenteria, vacina tífica.

Lucas de Assumpção: preparo dos soros e vacinas antimeningocócica, antiestreptocócica, antigonocócica e vacina estafilocócica.

Rocha Botelho: vacina jenneriana, tuberculina, maleína.

J. Vellard: organização de Museu e da sistemática de aracnídeos.

Vital Brazil: direção, preparo de soros antipeçonhentos e estudos sobre venenos.

— O prédio antes ocupado pelo Instituto de Veterinária está sendo adaptado para o Instituto Vacinogênico, que lá já estava funcionando, quando Vital Brazil assumiu a direção em Butantan.

— O prédio do Instituto de Medicamentos Oficiais foi adaptado para abrigar o Museu de ofídios e animais peçonhentos, peças anatômicas e quadros sinóticos para educação sanitária do povo e a seção de História Natural.

— Programa de trabalhos e estudos:

Preparo de todos os soros e vacinas para defesa sanitária do Estado e estudo de todas as questões que possam interessar a saúde pública.

Retomada dos estudos sobre ofidismo e outros animais peçonhentos; estudos de imunidade local com suas aplicações das enterovacinas de interesse imediato para a defesa sanitária.

— No período de afastamento de Vital Brazil aumentou o número de fornecedores de cobras por ter sido abolida a prática de troca de serpentes por soros e passando a ser pago em dinheiro. Quebra portanto do objetivo principal "a obtenção do material indispensável ao preparo do soro e o de colocar estes produtos nas mãos dos agricultores". A propaganda visando a remessa de serpentes deve ser paralela à do emprego dos soros, pois é preciso não esquecer que em curar as desgraçadas vítimas do ofidismo está a finalidade de todo nosso esforço humanitário. Este fato também contribuiu para o desequilíbrio financeiro do Instituto.

— De 5 a 28 de julho, período de Revolução foi suspensa a imunização de animais em serviço de soros antipeçonhentos, pela possibilidade de falta de recursos e pela anormalidade dos serviços de transporte.

— Em decorrência da Revolução de 24, houve aumento de produção do soro antitetânico, então muito solicitado.

1925

— Pelo decreto 3.876 de 11-7-1925 art. 58 os Institutos Bacteriológico, Soroterápico e Vacinogênico do Serviço Sanitário se localizarão em Butantan e constituirão todos sob o nome de Instituto Butantan.

— O Butantan continuou com seu programa de auxílio técnico ao Serviço Sanitário preparando soros e vacinas para defesa sanitária e, com a fusão dos três institutos, teve ampliadas suas atribuições, cabendo-lhes também os exames bacterioscópicos e bacteriológicos e preparo da vacina jenneriana.

— O primeiro posto de exames ficou instalado na antiga sede do Instituto Bacteriológico, sob a direção do assistente Lucas de Assumpção, lá trabalhando também Sebastião Calazans, Bruno Rangel Pestana e Eduardo Vaz.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

Lucas de Assumpção além da direção do posto de exames bacteriológicos e bacterioscópicos ficou encarregado do preparo dos soros antiestreptocócico, antipneumocócico, antigonocócico e antimeningocócico e das respectivas vacinas.

Rocha Botelho (sai do Instituto em agosto) e passa para Bulcão Ribas o preparo da vacina jenneriana, inspeção sanitária dos animais do estabelecimento e necrópsias dos animais que morreram durante o período de imunização.

Paulo Marrey e Eduardo Vaz: preparo dos soros e vacinas (soro e vacina antipestosa, soro antidisentérico e vacina tífica).

Lemos Monteiro: preparo dos soros antidiftérico e antitetânico.

Sebastião Calazans: exames bacteriológicos dos produtos.

Bruno Rangel Pestana: preparo e dosagem da tuberculina e maleína.

Afrânio do Amaral: sistemática de ofídios até sua transferência para o Museu Paulista, passando este serviço para J. Vellard, que também se incumbiu da direção do Museu e da sistemática dos aracnídeos, batráquios e outros animais peçonhentos.

José Bernardino Arantes: seção de protozoologia, até sua saída em primeiro de agosto.

Vital Brazil: além da direção do Butantan, se encarregou do preparo dos soros antipeçonhentos. Em colaboração com J. Vellard, o estudo dos venenos de aracnídios, batráquios e outros animais peçonhentos.

— Aumento do pessoal: foram contratados Eduardo Vaz, J. Vellard, Jaime Pereira, José Bulcão Ribas; J. Pires Fleury foi removido para o Instituto Butantan a pedido. Com a fusão dos institutos passaram a fazer parte do quadro técnico os assistentes do Bacteriológico: Sebastião Cala-

zans e Bruno Rangel Pestana. Continuaram em exercício dos cargos: Paulo Marrey, Lucas de Assumpção e Lemos Monteiro. Foram nomeados funcionários para administração: escriturários, guarda-livros, bibliotecários, zeladores de laboratórios, motoristas e vários auxiliares técnicos e serventes.

— Em 24-12 foi inaugurado o Pavilhão João Florêncio Gomes onde se instalou o Museu de Animais Peçonhentos e Saúde Pública e gabinetes de História Natural (antigo prédio do Instituto de Medicamentos Oficiais).

— Museu (pequeno histórico).

— O material do Museu começou a ser colecionado desde 1896 no Instituto Bacteriológico por Vitar Brazil. Esse material era constituído exclusivamente por serpentes conservadas em álcool. Com o preparo de soros antipeçonhentos em 1901, já em Butantan, e com a propaganda entre os agricultores foi possível aumentar a coleção consideravelmente. Em 1910, já dispunha de uma regular coleção de ofídios nacionais e outros obtidos através de permuta com os principais Museus dos Estados Unidos e Europa.

Por essa época entra João Florêncio Gomes (morreu em junho de 1918) que logo se dedica a estudos da sistemática dos ofídios e identificação de novas espécies. A ele sucedeu Afrânio do Amaral, que prosseguiu no estudo da biologia e sistemática das serpentes; transferido em 1925, para o Museu Paulista (Ipiranga) foi substituído por J. Vellard, a quem coube a incumbência de reorganizar o material do Museu, dispondo-o convenientemente para exposição ao público. Dado o espaço insuficiente de que dispunha o Museu, em uma das salas do Edifício Central, foi adaptado o prédio antes destinado ao Instituto dos Medicamentos Oficiais, para a instalação do pavilhão de História Natural, composto do laboratório, gabinete de estudo, depósito das coleções, sala de desenho e um grande salão para exposição do material ao público.

— Publicação de seis trabalhos de Vital Brazil e J. Vellard sobre estudos dos venenos.

— Normalizada a produção de soros antipeçonhentos, prejudicada no ano anterior, pelo movimento revolucionário, que afetou o transporte ferroviário, reduzindo assim o número de serpentes que chegavam ao Instituto.

— Foi publicado o segundo volume das "Memórias do Instituto Butantan".

1926

— Distribuição dos trabalhos técnicos:

Lucas de Assumpção: encarregado do Posto Bacteriológico, incumbido de preparo dos soros antimeningocócico, antiestreptocócico, antigonocócico e das respectivas vacinas. Estudos sobre reação de Wasserman e sobre tipos de meningocócica.

Joaquim Pires Fleury, ajudante do Posto Bacteriológico, encarregado do soro e da vacina antipestosa.

OLIVEIRA, J. L. Cronologia do Instituto Butantan (1888-1981) 1.ª Parte. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*: 11-79, 1980/81.

Eduardo Vaz, encarregado do soro antidisentérico, da vacina tífica T.A.B., por via oral e hipodérmica e da vacina BCG, estudos sobre imunidade local.

Lemos Monteiro, encarregado do preparo do soro antidiftérico e da anatoxina diftérica para uso profilático. Estudos dos vírus filtráveis.

Jaime Pereira, fisiologista, incumbido do curso de aperfeiçoamento e da pesquisa sobre venenos.

Bruno Rangel Pestana, encarregado do preparo da tuberculina e maleína.

Sebastião Calazans, encarregado do preparo do soro antitetânico e do soro antiescarlatinoso e do exame bacteriológico dos produtos do Instituto.

José Bulcão Ribas (veterinário) incumbido da fiscalização dos animais produtores e do preparo da vacina jenneriana.

J.A. Vellard, (naturalista), encarregado do Museu, estudo e classificação de ofídios e aracnídios. Em colaboração com o diretor preparou soros contra o veneno das aranhas e estudos sobre animais peçonhentos.

Paulo Marrey esteve em comissão de estudos na Europa, especializando-se no grupo dos germes anaeróbios, no Instituto Pasteur.

Vital Brazil, (Diretor), preparo dos soros antipeçonhentos estudos sobre venenos.

— Trabalhos de pesquisa: foram publicados no III volume das Memórias do Instituto Butantan e em outras publicações especializadas um total de 17 trabalhos científicos versando sobre estudos dos venenos, sobre imunização, estudos da sífilis, vacinas etc.

— Produtos do Instituto: vacina BCG; vacina tífica por via oral e hipodérmica; soro antidisentérico (usado largamente no combate aos surtos epidêmicos na Capital e interior); soro antipestoso (casos ocorridos na Capital e outros pontos do país); soro antidiftérico e anatoxina diftérica para uso profilático; grande procura vacina jenneriana com produção de cinco milhões de doses dada a epidemia ocorrida na Capital da República (R. de Janeiro) e em estados vizinhos. Em São Paulo, graças a intensa vacinação, houve pequeno número de vítimas.

— "Ofidismo é um dos objetivos do Instituto desde sua fundação e tem contribuído para o renome do estabelecimento."

Período	N.º de serpentes recebidas	N.º de ampolas de soro distribuídas
1901-1905	958	12.566
1906-1910	8.342	21.325
1911-1915	23.193	33.960
1916-1920	37.231	39.072
1921-1925	48.542	29.332
1926	12.052	10.000
	(maior n.º anual)	(maior n.º anual)

— Para avaliação dos efeitos do tratamento soroterápico foram utilizados três meios: boletins distribuídos com as ampolas de soro; informações pedidas diretamente às prefeituras e a comparação dos coeficientes de mortalidade por ofidismo, do período anterior à vulgarização do tratamento e do período em que se vulgarizou esse tratamento. A partir de 1902, a pedido de Vital Brazil, foi iniciada a Estatística Demógrafo-Sanitária para registrar os óbitos por ofidismo.

— Verificou-se que a partir de 1907, houve queda anual progressiva da mortalidade por acidente ofídico coincidindo com maior divulgação e distribuição dos soros.

— Necessidade do Instituto:

Solicitação do Diretor para que seja enviado anualmente um dos assistentes para viagem de estudos nos grandes centros do exterior para aperfeiçoamento técnico do Instituto.

Com a reforma do Serviço Sanitário em 1918, da formalização legal da exigência do tempo integral dos pesquisadores, Vital Brazil apontou a necessidade desses pesquisadores residirem em terras do Butantan, facilitando a plena utilização da mão de obra e de forma a resolver o problema de locomoção do centro da cidade para o Instituto.

Necessidade de aumento de pessoal especializado: um assistente de histologia patológica e outro de protozoologia.

Necessidade de construção de casa para o diretor e para funcionários e outras reformas nos edifícios.

— Paulo Marrey que esteve em Paris freqüentando curso de microbiologia no Instituto Pasteur critica o baixo nível de ensino e a decadência daquela instituição, alertando quanto aos perigos de supervalorizar os elementos estrangeiros em nossa terra.

— Foi publicado III Volume das "Memórias do Instituto Butantan".

— Em início de maio, Vital Brazil adoeceu, ficando um mês internado no Instituto Paulista.

— Quando reassumiu seu posto partiu em comissão para o Rio de Janeiro, de onde regressou a 14 de agosto.

— Impossibilitado de permanecer em São Paulo por não estar plenamente restabelecido, Vital Brazil solicitou sua demissão do cargo de Diretor do Instituto Butantan.

— Durante sua ausência e depois, com seu afastamento difinitivo, respondeu interinamente pela direção do Instituto, Lucas de Assumpção.

— Em três de outubro a direção do Posto Bacteriológico do Instituto, antigo Instituto Bacteriológico, passou para Carvalho Lima; havia sido dirigido por Lucas de Assumpção desde 1925.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

José Bernardino Arantes: preparo dos soros antidiftérico, antipestoso, vacina antipestosa, tuberculina e maleína.

Paulo Marrey: preparo dos soros antitetânico e antigangrenoso (seção micróbios anaeróbios).

Eduardo Vaz: preparo do soro antidisentérico.

Lucas de Assumpção, além da direção do posto bacteriológico e depois da direção do TB, se encarregou do preparo dos soros: antiofídico, anticrotálico, antibotrópico, soros e vacinas antimeningocócica, antiestreptocócica, antipneumocócica, antigonocócica, seleção de animais para produção de soros.

Lemos Monteiro: preparo da vacina jenneriana.

Eduardo Vaz: preparo da vacina contra tuberculose (BCG), antitífica e antidisentérica, coleção de cultura.

Antonio Mourão da Serpa Pinto: (farmacêutico do almoxarifado e Farmácia do Serviço Sanitário) respondeu pela seção de hipodermia e soluções medicamentosas.

José C. Ribas: serviços de veterinária.

Alcides Prado: malariologista do Serviço Sanitário adido a êste Instituto.

— Desde o ano anterior Vital Brazil orientava o assistente Lucas de Assumpção no preparo dos soros antiofídico e em 26 de abril de 1927 passava esse serviço a seu assistente.

— A produção de soros antipeçonhentos foi de 11.000 ampolas neste ano.

— Necessitava-se aumentar a propaganda para o envio de serpentes. O sistema de troca era quatro serpentes por um tubo de soro; por seis cobras, o Instituto fornecia também uma seringa com duas agulhas.

— No início a permuta era de uma cobra por tudo de soro; de 1920 a 24 (período de afastamento de Vital Brazil) o instituto deveria pagar quatro mil réis por cada cobra.

— Nestes últimos dois anos, teve aumentado o n.º de jararacas enviadas ao instituto devido à propaganda nos estados do Paraná e Sta. Catarina, onde a quantidade de jararacas era grande. E o aumento de cascavéis foi devido à colônia japonesa de São Paulo, que contribuía para envio dessas cobras, muito abundantes em nosso Estado.

— A taxa de mortalidade por acidente ofídico caiu muito, sendo nos últimos anos de 0,9 a 0,8 por mil. No ano de 1927 a mortalidade total foi de 92.207 sendo, por ofidismo, apenas 84.

— Bruno Rangel Pestana e Joaquim Pires Fleury passaram a ser assistentes no Posto Bacteriológico; Sebastião Calazans foi comissionado para Pelotas e J. Vellard retirou-se do instituto.

— Solicitação ao governo da concessão de vencimentos de tempo integral aos assistentes e do envio de cientistas para aperfeiçoamento no exterior.

1928

— Afrânio do Amaral foi nomeado diretor do Instituto Butantan, assumindo em 12-03.

— Distribuição dos Serviços Técnicos (Reorganização dos serviços):

J.B. Arantes: soros antipeçonhentos (antivenenos crotálico, botrópico monovalente e polivalente, ofídico, escorpiônico, licósico ectenolicósico); soro antidisentérico, antipestoso e diagnóstico anátomo-patológico. Sempre que o diretor se ausentou, respondeu pelo expediente da diretoria.

Lemos Monteiro: vacina jenneriana e investigações gerais sobre vírus (foi criada seção de vírus).

Paulo M. de B. Marrey: serviço de toxina tetânica e diftérica; antitoxinas tetânica e diftérica: Prosseguiu seus estudos sobre anaeróbios, visando produzir soros antigangrenosos.

Fernando Paes de Barros, que veio transferido do Laboratório da Inspetoria de Alimentação Pública, ocupou-se da morfologia e classificação de bactérias; museu de culturas; orientação científica do serviço de meios de cultura; vacinas bacterianas injetáveis (tífica, paratífica, disentérica) vacina per-os; filtrados bacterianos (antivírus de Besredka).

Luiz Viana: serviço de coccos em geral (identificação e conservação e preparo de vacinas correspondentes e os devidos soros). Preparação para iniciar a produção de soro antiescarlatinoso.

Sebastião Calazans continuou em comissão em Pelotas.

Eduardo Vaz pediu demissão em 8 de maio.

Lucas de Assumpção pediu transferência para o Instituto de Higiene.

Afrânio do Amaral: direção, seção de ofiologia, museu e registro de serpentes.

— Reorganização das seções, reforma e modernização das instalações.

— Necessidade de contratar maior número de técnicos superiores e reaparelhamento do Instituto.

— A diretoria do Instituto foi autorizada pelo governo a aplicar a verba oriunda da venda de seus produtos no próprio Instituto.

— Instalação de sala de refeições para funcionários; compra de aparelhos: raspadeira elétrica, pipetas padrão, gasômetro tipo Tangye Suction; aquisição de cavalos (131 cavalos).

— Foi derrubado grupo de casas de empregados o chamado "cortiço" em péssimas condições, bem como a "cocheira velha" (atual Museu Histórico).

— Início da construção de casas para empregados.

— Reforma da antiga casa da fazenda para residência temporária do diretor (atual seção de herpetologia) para ulterior aproveitamento como sede das escolas reunidas de Butantan.

— Instalação do Posto de Higiene do Butantan destinado ao atendimento de funcionários e crianças residentes no Instituto e redondezas.

— Instalação de bomba para captação de água do Ribeirão Pirajussara.

— Revestimento e impermeabilização das estradas internas do Instituto.

— Seção agrícola reformulada, com seção de obras; início construção de biotério geral para criação de coelhos, cobaias, pombos e outros

pequenos animais; criação de animais e mesmo de hortas para alimentação de funcionários residentes; reaproveitamento de lixo para adubação.

— Horários fixos para saída dos automóveis de condução de funcionários e inauguração de um ônibus, montado nas oficinas do Instituto. Foi aberta estrada de rodagem de Pinheiros a Butantan pelo governo.

— Comissões:

José Lemos Monteiro esteve no Rio de Janeiro para acompanhar trabalhos sobre transmissão experimental da febre amarela e preparo de vacina e soro antiamarílico.

Afrânio do Amaral esteve nos USA de novembro de 1925 a 11 de março de 1927 montando o Antivenin Inst. of America.

— Solicitação ao Governo do Estado:

Aumento do salário dos funcionários equiparando-os aos do Instituto Biológico (Secr. da Agricult.) com salários quatro vezes maiores.

Reforma do Instituto de forma a ampliar suas finalidades e esfera de ação, transformando-o em um laboratório de Medicina Experimental, dedicado especialmente a investigações de Patologia humana.

Aumento do número de assistentes, devendo o Instituto dispor de: um diretor encarregado de seção; dez assistentes encarregados de seção; cinco assistentes de pesquisa; um adjunto, encarregado do Horto Osvaldo Cruz; três preparadores; um conservador do Museu e das coleções; seis técnicos de laboratórios; dezesseis auxiliares de laboratórios; um secretário-tradutor, além dos atuais servidores administrativos.

Construção de serpentário, de forma científica, para diminuir a mortalidade de ofídios.

— Neste ano a produção de vacina jenneriana possibilitaria a vacinação de 1.982.600 pessoas, sendo fornecida para vários Estados.

— Foram produzidos ainda experimentalmente soros para tratamento de coqueluche.

O governo ainda não atendeu solicitação do ano anterior de aumento de verbas e pessoal, impossibilitando as melhorias programadas.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

J.B. Arantes: antivenenos (soros antipeçonhentos) serviço de peste e pesquisas histopatológicas.

P.M. Barros Marrey: serviço de tétano e culturas de anaeróbios; preparo de antitoxinas e anatoxina diftérica e soro antidisentérico.

J. Travassos da Rosa, assistente interino, na vaga de Camargo Calazans, em comissão no Instituto de Higiene de Pelotas. Ocupou-se da seção de soros antibacterianos, tendo reiniciado o serviço de preparo de bacterinas contra os diversos coccos patogênicos.

Luiz Viana voltou para Maranhão, sua terra natal, ficando lá como assistente da filial do Instituto Oswaldo Cruz.

F. Paes de Barros seção de bacterioterapia, Museu de Culturas e preparo de meios de cultura.

Cícero Neiva substituiu Bulcão Ribas. Incumbiu-se da revisão do grupo de germes disentéricos e paradisentéricos.

Afrânio do Amaral ofiologia e zoologia médica.

J. Lemos Monteiro seção de vírus e laboratório vacínico, auxiliado por R. Braga Godinho, nomeado assistente.

— Aumento sistemático do recebimento de serpentes.

— Publicação de vários trabalhos científicos de Lemos Monteiro (7) Afrânio do Amaral (18).

— A redução de verbas e de pessoal técnico do Instituto, prejudicando seu desenvolvimento.

— Redução de cavalos imunizados.

— Perda da produção de forragem, devido a enchentes do Rio Pinheiros.

— Terminadas as reformas iniciadas no ano anterior.

— Era projeto do Diretor, iniciar reformas das salas de sangria, meios de cultura, concentração de plasma, filtração, distribuição e acondicionamento de produtos. Reformas do biotério anexo ao Laboratório Central e do cobril das espécies venenosas.

— Não foi destacado um inspetor sanitário ou médico para tomar conta do Posto de Higiene, que só funcionou alguns meses.

— Reorganização dos serviços de contabilidade.

— Foi autorizada a contratação de um bioquímico estrangeiro D. von Klobusitzky.

— Foram instalados dois laboratórios para estudos sobre vírus filtráveis, sendo estudados a febre amarela e o vírus tuberculoso.

— Foram encomendados pelo Instituto 100 macacos rhesus e feitas as instalações para os trabalhos experimentais de febre amarela.

— Foi iniciado o fornecimento de vacina BCG para uso subcutâneo para imunização de adolescentes e adultos. Foi publicado o IV volume das "Memórias do Instituto Butantan".

— Surgiu nos arredores de São Paulo infecção desconhecida que matava 80% dos doentes, (tifo exantemático).

— O Posto Bacteriológico estava ligado ao Butantan apenas formalmente.

Apesar de contar com apenas sete assistentes e da redução orçamentária, o Instituto Butantan apresentou situação administrativa e econômica favorável, precisando, no entanto, da efetivação da reorganização geral do Instituto.

— Distribuição dos Trabalhos Técnicos:

Lemos Monteiro; laboratório Central: seções correspondentes à imunidade ativa e passiva; restabelecimento da produção de antitoxina tetânica.

J.B. Arantes antivenenos, serviço de peste, pesquisas histopatológicas e serviço de difteria.

J. Travassos da Rosa produção de bacterinas e de soros antibacterianos; início do preparo do soro antiestreptoescarlatinoso e estudos sobre sorologia.

C. Neiva produção soro antidisentérico e reorganização geral do Museu.

S. C. Calazans reassumiu seu cargo, trabalhando no Butantan e no Posto Bacteriológico. Estava encarregado do serviço de preparo do soro antigangrenoso, produção de bacterinas tífico-paratíficas e disentéricas.

— Laboratório Experimental (Lemos Monteiro) superintendência da seção de vírus e virusterapia, estudos sobre febre amarela experimental e tuberculose.

— Laboratório Vacínico da Seção de Vírus (R. B. Godinho) aperfeiçoamento dos processos técnicos da vacina variólica.

— Seção de Ofiologia e Zoologia Médica: Afrânio do Amaral.

— Contratação:

Alcides Prado (malariologista) estudos sobre questões concernentes à entomologia e parasitologia, iniciando a organização das coleções da seção.

Dionysio von Klobusitzky especialista em físico-química em institutos austro-húngaros e alemães, que aqui montaria o primeiro laboratório de físico-química para pesquisas sobre os fenômenos de imunidade e aperfeiçoamento dos métodos sorológicos.

— Foi destacado o inspetor C.A. do Espírito Santo como encarregado do Posto de Higiene, que atendeu em dez meses de funcionamento a 2.796 pessoas. Foi destacada para serviço no Posto de Higiene a educadora sanitária Nadia Campelo de Souza.

— Trabalhos agrícolas e de construção:

Construção de duas casas e reformas de outras quatro do tipo rural.

Reforma e instalação definitiva da seção de meios de cultura e de esterilização de material.

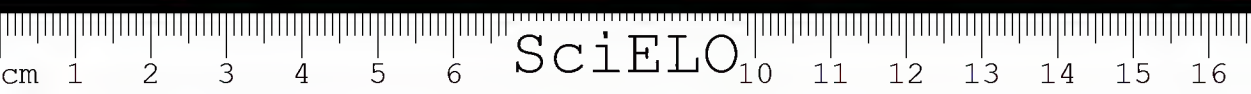
Canalização de águas pluviais.

Início da construção da residência para diretor.

— O serviço de transporte passava a ser feito por uma empresa particular.

— Diminuição do recebimento de cobras devido:

a) à crise econômica, que resultou no fechamento de muitas fazendas e redução de colonos e b) ao movimento revolucionário de outubro com a interrupção do tráfego ferroviário.

— Foi sugerida a reorganização geral do Instituto e sua separação do Serviço Sanitário, de forma a lhe dar maior autonomia financeira e de desenvolvimento.

— Foram publicados vinte e cinco trabalhos científicos originais, sendo sete deles sobre ofiologia e de autoria de Afrânio do Amaral, publicados no IV volume das Memórias do Instituto. O V volume, já no prelo, correspondia ao ano de 1930, com trabalhos de Lemos Monteiro, J. Travassos, A. do Amaral, C. Neiva e D. Klobusitzky.

Os dados referentes a 1931 e 1932 foram obtidos através de consulta ao Decreto 4.941 de 21-03-1931 que reorganizou o Instituto Butantan e da publicação de Afrânio do Amaral "Cinco Anos de Reorganização do Instituto Butantan" à luz do seu 32.º relatório anual, janeiro 1933.

— O decreto n.º 4.891 de 13-02-1931 desanexava da Diretoria Geral do Serviço Sanitário do Estado o Instituto Butantan que passava a ser subordinado à Secretaria da Educação e da Saúde Pública.

— O artigo 40 do mesmo decreto desanexava o Instituto Bacteriológico do Instituto Butantan.

— O Instituto Butantan foi reorganizado como um centro de medicina experimental tendo por fim:

a) realizar toda sorte de trabalhos científicos sobre animais venenosos;

b) estudar questões referentes à patologia humana ou a ela aplicáveis, investigando especialmente os fenômenos de imunidade e outros que surgirem no decurso dos trabalhos, de acordo com a tradição do estabelecimento;

c) preparar produtos biológicos necessários à defesa sanitária e substâncias empregadas em terapêutica humana;

d) realizar investigações sobre plantas medicinais brasileiras, tratando de isolar seus princípios ativos aplicáveis em medicina humana, aproveitando as instalações do antigo Horto Oswaldo Cruz;

e) fiscalizar o comércio de produtos biológicos, aferindo aqueles que tiverem aplicação na terapêutica ou na profilaxia de enfermidades humanas;

f) realizar excursões científicas ao interior para o estudo de moléstias, dentro das finalidades do Instituto;

g) instalar e manter postos antiofídicos ou filiais onde for julgado conveniente, a fim de estender às zonas rurais o benefício de sua influência;

h) organizar e manter cursos práticos de especialização e de divulgação científica, dentro de suas finalidades;

i) divulgar amplamente, por meio de publicações, os resultados de seus estudos;

j) estabelecer contato e permuta com outros centros científicos, para manter-se em dia com os progressos de Medicina Experimental;

k) cobrar as taxas fixadas pelo regulamento de fiscalização de produtos biológicos;

l) aceitar doações, mediante prévia autorização do Governo;

Art. 2.º — Para a boa marcha dos trabalhos, os serviços do Instituto Butantan ficariam divididos em dois grupos:

a) serviços administrativos, compreendendo a Diretoria com as Seções de Administração, Animais Imunizados e Culturas e obras;

b) serviços técnicos, sob a superintendência do Diretor, que os distribuirá em Seções, de acordo com o regulamento interno do Instituto.

— Foi instituído o regime de tempo integral para os assistentes-chefes.

— Foram instituídas as escolas rurais no Butantan.

— O Instituto fornecerá gratuitamente ao Serviço Sanitário os produtos solicitados e o excesso da produção seria vendida e a renda revertida no próprio Instituto.

— O Instituto deveria incrementar sua produção industrial e organizaria uma "Seção comercial, pondo a sua testa um profissional de reconhecida competência e idoneidade".

— A seção de Protozoologia e Parasitologia ficava provisoriamente anexa à de Ofiologia e Zoologia Médica, a cargo do diretor.

— O quadro funcional do Instituto ficava assim:

a) serviços administrativos, na diretoria: um diretor-superintendente, um bibliotecário, um ajudante de bibliotecário, um desenhista-ceroplasta, um fotomicrografista-adjunto, um preparador, dois serventes; na administração: um administrador-almoxarife, um guarda-livros, um ajudante de guarda-livros, um protocolista, três auxiliares de escrita, um porteiro-telefonista, quatro motoristas, quatro serventes. Na seção de animais imunizados: um chefe de cocheira, oito serventes. Na seção de culturas e obras: um chefe, um jardineiro, dez serventes;

b) serviços técnicos nas diversas seções: quatro assistentes-chefes, cinco assistentes, dois preparadores, doze auxiliares técnicos e doze serventes técnicos.

— O decreto 4.998 de 27-04 dava regulamento ao decreto 4.941 de 21-03 que reorganizou o Instituto.

— Ao diretor-superintendente competia entre outras funções:

a) orientar e dirigir os trabalhos técnicos e administrativos;

b) superintender, como assistente-chefe, os serviços da seção de Ofiologia e Zoologia Médica e bem assim os de Protozoologia e Parasitologia, enquanto esta estiver anexa àquela;

c) designar funcionários para execução dos serviços técnicos administrativos;

d) propor ao governo nomes para o preenchimento dos cargos de nomeação ou de contrato criados, ou que se vagarem;

e) contratar, dispensar, licenciar e punir os motoristas, serventes-técnicos, serventes e jardineiro constantes do quadro e admitir artífices e operários, dentro dos limites das verbas do estabelecimento;

f) organizar o programa de concursos para o preenchimento de vagas do quadro, dirigindo-os pessoalmente e designando entre os funcionários superiores do Instituto os necessários examinadores, a juízo do governo;

g) propor ao governo nomes de funcionários para fazerem excursões científicas ou viagens de estudo, arbitrando-lhes diárias, de acordo com o governo;

h) apresentar relatórios anuais sobre os trabalhos da repartição, com sugestões sobre os meios de aumentar a eficiência dos serviços;

i) fiscalizar a confecção das "Memórias" e outras publicações científicas do Instituto;

j) informar, sempre que lhe for ordenado pelo governo, sobre a marcha dos serviços do Instituto;

k) apresentar em tempo, ao governo, dados para a confecção do orçamento no qual deverá ser incluída a verba para pagamento de tempo integral ao pessoal técnico superior.

— Ao administrador-almoxarife competia entre outras funções:

a) manter em dia e em ordem os serviços de administração, expediente, registro, escrituração e movimento dos funcionários;

b) adquirir e distribuir pelas seções o material necessário, fiscalizando o seu emprego e conservação;

c) organizar e manter em dia os serviços do almoxarifado apresentando um balancete mensal e inventário anual sobre seu movimento;

d) preparar editais e providenciar sobre a impressão de folhetos, circulares e outros papéis de uso da repartição;

e) fiscalizar o ponto dos funcionários;

f) organizar a folha de pagamento do pessoal do Instituto;

g) fiscalizar o serviço do guarda-livros;

h) fiscalizar a conservação dos edifícios e casas de residência.

— Ao guarda-livros competia entre outras funções:

a) trazer em dia o serviço de contabilidade, escrituração de todo o movimento de produção e despesas das seções;

b) examinar e conferir todas as contas e faturas de fornecimentos, antes do respectivo processo de pagamento ficando responsável pelos erros ou omissões cometidas;

c) trazer em dia e em ordem a escrituração sobre movimento de produtos e de permutas com os fornecedores do interior.

— O ajudante de guarda-livros, protocolista e auxiliares de escrita sobre o auxílio aos trabalhos referentes à seção, catalogação da biblioteca, serviços de compra e permuta de livros e outras publicações, escrituração sobre o movimento geral da biblioteca, colaborar com o correspondente na organização de resumos e fichamentos de trabalhos.

— Ao desenhista-ceroplasta compete entre outras funções: os desenhos de caráter científico, preparar as peças de cera e outro material necessário ao Museu Médico, serviço fotomicrográfico, fotográfico do Instituto, auxiliar os serviços técnicos da seção de Protozoologia e Parasitologia.

— Ao chefe de cocheira competia entre outras funções: tratar convenientemente de todos os animais usados no serviço de soroterapia e outros;

dirigir o serviço de injeções e sangrias; o registro do movimento da seção e as folhas de observações clínicas; realizar as necroscopias.

— Ao chefe de Cultura e Obras competia entre outras funções: dirigir os trabalhos agrícolas; fiscalizar o movimento dos empregados diaristas, operários e artífices; fiscalizar a construção; fiscalizar o serviço de automóveis; fiscalizar a manutenção do parque etc., e dos preparadores, porteiro-telefonista, motorista, jardineiro, serventes, auxílio e execução de manutenção do Instituto.

— A divisão dos serviços técnicos ficou assim dividida:

1. Seção de Ofiologia e Zoologia Médica: diretor;
2. Seção de Protozoologia e Parasitologia: a cargo do diretor-assistente Alcides Prado;
3. Seção de Imunologia Experimental e Soroterapia: J. Bernardino Arantes, Flávio de Fonseca e Joaquim Travasso;
4. Seção de Bacteriologia Experimental e Bacterioterapia: S. de Camargo Calazans, assistente Cícero Neiva;
5. Seção de Vírus e Virusterapia: Lemos Monteiro e R. Godinho;
6. Seção de Físico-química Experimental: Klobusitzky;
7. Seção de Botânica Médica;
8. Seção de Química e Farmacologia Experimental;
9. Seção de Fisiopatologia Experimental;
10. Seção de Citologia, Embriologia e Genética Experimental.

— A seção de Ofiologia e Zoologia Médica competia entre outras funções:

a) estudar ofídios e outros animais de interesse médico ou higiênico;

b) organizar o Museu Médico para divulgação dos trabalhos do Instituto;

c) dirigir a campanha dos ofídios e outros animais venenosos;

d) organizar conferências e palestras com intuito de divulgar conhecimentos referentes ao assunto;

e) manter permuta de material com outros laboratórios;

f) informar as consultas relativas à seção.

— A seção de Imunologia Experimental e Soroterapia competia entre outras funções:

a) estudar todas as questões referentes aos fenômenos de imunidade;

b) entregar ao serviço o produto de suas experiências, para a devida aplicação;

c) preparar, dosar e aferir todos os soros, antivenenos e antitoxinas usados no tratamento e profilaxia de enfermidades humanas;

d) analisar e aferir soros, antivenenos e antitoxinas preparados por laboratórios particulares, para consumo público, tudo de acordo com instruções que constituirão objeto de decreto especial.

— À seção de Bacteriologia Experimental e Bacterioterapia competia entre suas funções:

a) investigar questões relativas a bactérias patogênicas;

b) conservar o Museu de Culturas;

c) entregar ao serviço, o produto de suas experiências, para a devida aplicação;

d) preparar bacterinas, filtrados bacterianos e outras substâncias de emprego corrente no tratamento e profilaxia de moléstias infectuosas humanas;

e) analisar produtos de origem bacteriana empregados no tratamento e profilaxia de enfermidade humanas e preparados por laboratórios particulares.

— A seção de Vírus e Virusterapia competia entre outras funções:

a) investigar questões referentes a moléstias humanas produzidas por vírus, tais como varíola, varicela, sarampo, tracioma, poliomielite, influenza (gripe), febre amarela, tifo exantemático e outras.

b) estudar experimentalmente a ação de bacteriófagos e tratar de seu preparo;

c) preparar vacina animal contra a varíola.

— À seção de Físico-química Experimental compete entre outras funções:

a) estudar experimentalmente questões referentes aos fenômenos vitais e especialmente os de imunidade;

b) investigar a composição dos lipóides e colóides;

c) concentrar e refinar plasmas fornecidos pelo serviço de soroterapia;

d) dirigir cientificamente o preparo dos meios de cultura;

— À seção de Protozoologia e Parasitologia compete entre outras funções:

a) estudar os principais artrópodes e protozoários parasitas, veiculadores ou causadores de enfermidades humanas;

b) pesquisar meios de tratamento e profilaxia contra os mesmos;

c) investigar fenômenos de imunidade no decurso de doenças produzidas por protozoários e parasitas.

— À seção de Botânica Médica competia entre outras funções:

a) estudar plantas indígenas de interesse médico ou higiênico;

b) cultivar e realizar observações biológicas sobre espécies empregadas na terapêutica popular, afim de contribuir para a nossa matéria médica;

c) organizar herbários e coleções para a divulgação dos trabalhos da seção;

d) organizar exposições e conferências para interessar o público no aproveitamento das espécies medicinais;

e) manter permutas de material com outros laboratórios;

f) informar as consultas relativas à seção.

— À seção de Química e Farmacologia Experimental competia entre outras funções:

a) investigar todas as questões de química que surgissem no decurso dos trabalhos do Instituto;

b) isolar princípios ativos de venenos animais e de plantas reputadas medicinais;

c) estudar a ação farmacodinâmica de princípos ativos, de venenos e plantas;

d) colaborar com outras seções no esclarecimento de problemas em investigação;

e) realizar todas as pesquisas químicas sugeridas pelo diretor;

f) investigar a ação de princípios endócrinicos e outros que constituam objeto de trabalho no Instituto.

— À seção de Fisiopatologia Experimental competia entre outras funções:

a) colaborar no esclarecimento da ação exercida sobre o organismo pelos venenos e toxinas animais e princípios ativos vegetais;

b) pesquisar lesões produzidas por micróbios e parasitas do domínio da patologia humana;

c) tratar de desenvolver experimentalmente métodos aplicáveis à cirurgia humana;

d) investigar em sua subseção de Endocrinologia, a ação das secreções internas, preparando produtos endocrínicos (opoterápicos) devidamente dosados e aferidos;

e) investigar em colaboração com as seções de Química e Físico-química, o mecanismo da ação das vitaminas;

f) analisar produtos opoterápicos do comércio.

— À seção de Citologia, Embriologia e Genética Experimental competia entre outras funções:

a) estudar experimentalmente os fenômenos da atividade celular, reprodução, hereditariedade, variação e seleção;

b) fazer conferências e divulgar, por meio de publicações os resultados de seus estudos.

— Somente as seis primeiras seções funcionariam este ano posto que já existentes. A medida das necessidades do serviço e disponibilidade de recursos financeiros as demais seriam instaladas.

— Benfeitorias das instalações do Instituto:

Remodelação dos serviços de concentração e refinação de plasmas, filtração e distribuição de produtos e de acondicionamento.

Instalação de sistema de vácuo e pressão para uso dos laboratórios com controle central.

Quatro casas tipo rural para residência de funcionários.

Construção de casa para residência do diretor (atual Diretoria Técnica).

Reforma da antiga sede da chácara, onde se instalara o diretor, para sede do Grupo Escolar Rural e apartamentos dos técnicos.

— Neste ano foram publicados 43 trabalhos científicos.

1932

— O relatório de 1932 está sob forma de publicação "Cinco anos de Reorganização".

— A dotação de verbas para o Instituto veio declinando desde 1927: 1927 — 1.395:107$760; 1931 — 1.054:925$000.

— Apesar da produção vir aumentando progressivamente: 1927 — 668:405$000; 1931 — 908:142$803, apresentando aumento nos períodos revolucionários de 30 e 32: 1930 — 1.310:748$400; 1932 — 1.505:104$050 (em julho de 32 o Instituto recebeu crédito especial pelo Comando Geral da Força Pública de 127:003$660) a verba global de 1932 foi 1.175:403$660.

— Sugestões:

Aumento da verba de 200:000$000 para instalar novos serviços como de Botânica Médica (para cultivo e estudo de plantas medicinais) e de Fisiopatologia Experimental (com as sub-seções de Fisiologia, Endocrinologia e Histopatologia) que criariam renda através da venda de seus produtos: venda de plantas medicinais e de preparados opoterápicos, representando fonte de recurso para o estabelecimento.

— Orientação e intensificação dos serviços de produção de soros, antitoxinas, antivenenos, bacterinas, vacinas e outras substâncias biológicas.

— O número de obras decresceu pela crise financeira do ano anterior, daí orientação mais voltada ao aspecto social dos funcionários:

Incremento da Caixa Beneficente mantida pelos funcionários e a criação de Cooperativa com fundos da Caixa Beneficente para fornecimento de gêneros de primeira necessidade. Construção de campo de esportes.

— No período revolucionário, o Butantan atingiu recorde de produção de soro antitetânico fornecido principalmente às tropas. Em função desse aumento para atender demanda o Instituto solicitou empréstimos a Associação Comercial e a MMDC e mesmo de criadores de animais para aumentar números de cavalos para serviço de imunização e requisição de outros materiais necessários à construção de novos alojamentos e manutenção dos animais recebidos.

— Daí a construção de galpões para semientabulação de cavalos imunizados, um abrigo para eqüinos do serviço de criação e seleção racial.

— Foi construído também báias para alojar vitelos do serviço de vacina variólica.

— Início da criação de suínos de raça, como subproduto da Seção Agrícola, para nova fonte de renda e aumento de Biotério Geral.

— Foi constituído alambique para destilação de água requisitada pelo Serviço Sanitário.

— Neste ano foram publicados 41 trabalhos científicos.

— Foram realizados os serviços de análise dos produtos biológicos, que desde 1925 haviam sido interrompidos.

— Novos produtos: vacina variólica pura, soro vacínico (coqueluche); anatoxina tetânica; antitoxina super concentrada; soro antitoxina escarlatínica, soros antigangrenosos, soro antitoxina anaeróbica, bacterina tífico-disentérica injetável, lipo-soros (normais para tratamento de perturbações nervosas e antitoxigrávídicos para tratamento das perturbações toxêmicas da gravidez).

1933

— "Devido ao desfecho da Revolução Constitucionalista no segundo semestre de 1932 é alarmante a instabilidade política no semestre seguinte: todos os estabelecimentos técnicos dotados de produção industrial sofreram crise mais ou menos intensa nos oito primeiros meses de 1933", pg. 1, Rel. Annual, 1933.

1. Seção de Ofiologia e Zoologia Médica: assistente-chefe Afrânio do Amaral.

— Houve decréscimo na produção de venenos em conseqüência das perturbações na vida agrícola pela revolução. A produção científica teve dez trabalhos publicados de Afrânio do Amaral, em colaboração com Lemos Monteiro e Vieira Marcondes.

— Foram remetidos 354 folhetos descritivos dos produtos do Instituto para os fornecedores de serpentes, 402 seringas e 197 caixas; o Instituto recebeu 23.066 serpentes.

2. Seção de protozoologia e parasitologia (assistente Alcides Prado) realizou 683 exames de material e aumentou a coleção de artrópodes e de helmintos a 1.401 exemplares. Publicou três trabalhos científicos.

3. Seção de Imunologia e Soroterapia (assistente-chefe J.B. Arantes e assistentes J. H. Travassos e Flávio da Fonseca).

— Produção de soros antipeçonhentos, antidiftérico e antitoxina diftérica; verificação da esterilidade dos produtos; serviço de antitoxina tetânica.

— Produção científica: quinze trabalhos publicados nas Memórias, em revistas nacionais e estrangeiras, destacando-se trabalhos de Flávio da Fonseca sobre ácaros.

4. Seção de Bacteriologia e Bacterioterapia (assistente-chefe S. C. Calazans e assistente C. Neiva), encarregado do preparo de todas as bacterianas, injetáveis e ingeríveis, além dos soros antidisentérico e antigangrenoso, das tuberculinas e do Museu Bacteriológico. Subseção de soroterapia antibacteriana (assistente Joaquim Travassos) realizou estudos experimentais principalmente da toxina e antitoxina estafilocócica que permitiu lançar dois novos produtos: a anatoxina e a antitoxina estafilocócica. Oito trabalhos publicados.

5. Seção de Vírus e Virusterapia (assistente-chefe Lemos Monteiro, assistente Raul Godinho) vacina variólica, bacterina tuberculosa e bacterina pestosa e o soro correspondente; estudos sobre o cultivo de vírus variólico no embrião da galinha e novas pesquisas sobre "tifo exantemá-

tico de São Paulo". A produção de vacina variólica tem sido maior que a do Instituto Vacínico Federal. Produção Científica: seis trabalhos publicados.

6. Seção de Físico-química (assistente-chefe: D. von Klobusitzky) cinco trabalhos publicados: realizou 637 trabalhos de físico-química (PH) e 117 de química. Foi publicado o VII Volume das Memórias.

1934

— Desenvolvimento gradual dos trabalhos realizados no Butantan. Aumento da verba do Estado da ordem de 210:500$000 sendo portanto sua despesa líquida por conta do Tesouro de 1.247:325$300 e a produção global de 1.619:405$050 tendo saldo positivo de 372:079$750. O Instituto recebeu crédito especial de 62:000$000 para construção do pavilhão especial, com 20 laboratórios para estudos experimentais e preparo de vacina contra febre maculosa de São Paulo (tifo exantemático).

— Dada à exigüidade de verbas destinadas ao setor agrícola, foram feitas apenas reformas dos prédios, destacando-se a do Laboratório Vacínico de forma a unificar todo o serviço de produção da vacina variólica.

— Serviços Técnicos:

1. Seção de Ofiologia e Zoologia Médica: (A. Amaral) prosseguimento dos serviços de propaganda científica e permutas, recebimento de animais peçonhentos e extração de venenos. Foram publicados doze trabalhos científicos.

2. Seção de Protozoologia e Parasitologia (A. Prado) realizou 771 exames diversos; elevou para 1.572 o número de exemplares de suas coleções e o prosseguimento dos estudos referentes a protozoários e parasitas, relacionados com enfermidades humanas. Publicou seis trabalhos científicos.

3. Seção de Imunologia e Soroterapia (J. B. Arantes com os assistentes J. H. Travassos e F. da Fonseca) produção de soros antipeçonhentos, antitoxina diftérica, soros anticocos, antitoxina e anatoxina estafilocócica, bacterinas cocos. Publicou oito trabalhos científicos.

4. Seção de Bacteriologia e Bacterapia (S. Calazans com o assistente C. Neiva). A fabricação das bacterinas antitífico-paratíficas, antidisentérica, antidisentérica mista; a antitífico-disentérica passou para responsabilidade do Dr. Calazans, e para o Dr. Neiva o preparo das tuberculinas. Esta seção também fabricava o soro antigangrenoso e era responsável pelo Museu de Culturas e serviço de meios de cultura. Várias pesquisas estavam sendo realizadas sobre o soro anticoli e antitífico. Foram publicados três trabalhos científicos.

5. Seção de Vírus e Virusterapia (Lemos Monteiro, assistente Raul Godinho, auxiliar-técnico Edison Dias) a cargo do preparo da vacina variólica, da bacterina tuberculosa BCG, da bacterina pestosa e do soro correspondente. Neste ano foram produzidas 2.632.800 doses de vacina variólica. Foram publicados dezesseis trabalhos científicos, principalmente sobre o "tifo exantemático de São Paulo" estudado por Lemos Monteiro.

6. Seção de Físico-química: Klobusitzky. A finalidade principal desta seção era a orientação dos trabalhos sobre imunologia e soroterapia.

Neste ano foi terminada a instalação desta seção que ocupava quatro laboratórios com aparelhos de alta precisão. Foram publicados três trabalhos científicos.

— Seções novas:

Foi instalada a seção de Fisiopatologia Experimental que iniciava pesquisas sobre glândulas endócrinas e realizou trabalhos para a produção de hormônios de aplicação terapêutica como fonte de renda para o Instituto. Foi encarregado da seção como assistente-chefe Thales Martins. A produção industrial estava dependente da instalação das seções de Química e Farmacobiologia, o que para tanto deveriam ser contratados os necessários técnicos no estrangeiro (Alemanha e Áustria). Foram publicados cinco trabalhos científicos.

Seção de Botânica Médica (farmacognosia). Foi instalada esta nova seção cujo encarregado era o assistente-chefe Waldemar Peckolt que aproveitou as antigas instalações do horto "Oswaldo Cruz" e a área nele cultivável principalmente para estudar e produzir substâncias terapêuticas de origem vegetal, mais uma fonte de renda para o Instituto. Além de atender 47 consultas foram publicados treze trabalhos científicos.

— Foi publicado o vol. VII das "Memórias do Instituto Butantan" com trinta e um trabalhos. O Instituto recebeu em permuta por esta publicação 160 revistas científicas diversas.

— Participação do Instituto Butantan, através da escola rural por ele mantida no Congresso de Ensino Rural na Bahia.

— Com o desenvolvimento da assistência médica fornecida pelo Instituto através da Policlínica, preparação de terreno para futura instalação do primeiro hospital regional.

1935

— Aumento da dotação orçamentária permitiu implantar novas seções previstas no regulamento de 1931, sedimentar e complementar aquelas já existentes e ampliar o quadro de técnicos superiores.

— A produção científica decresceu, sendo produzidos 45 trabalhos, 27 dos quais publicados no vol. IX das "Memórias".

— Participação do Instituto Butantan no VI Congresso da Médica Panamericana tendo sido por essa ocasião inaugurado o novo pavilhão destinado a "estudos sobre tifo exantemático, febre amarela e outras enfermidades perigosas".

— Surto de febre amarela na fronteira do Estado e de febre petequial paulista na Capital e arredores.

— Reformas nos serpentários, na cocheira, construção de grupo novo de gaiolas no Biotério Geral.

— Comissões científicas: Afrânio do Amaral esteve na Europa, de agosto a novembro, comissionado pelos governos de São Paulo e do Brasil; representando-os no XII Congresso Internacional de Zoologia (Portugal) e no X Congresso de História de Medicina (Espanha). O assistente-chefe Tales Martins, da seção de Fisiopatologia Experimental, participou do

Congresso Internacional de Fisiologia (Moscou) e visitou laboratórios existentes na Alemanha, França e Inglaterra.

— Durante ausência de Afrânio do Amaral esteve encarregado da diretoria o assistente-chefe J. B. Arantes. Houve desavenças internas entre os assistentes; o encarregado da Seção de Bacteriologia determinou reformas dos laboratórios daquela seção acima do previsto pelo orçamento.

— Lemos Monteiro e seu axiliar Edson Dias contraíram tifo exantemático durante os trabalhos de preparação da vacina falecendo, ambos, em conseqüência do acidente (6-11).

— Crise política-administrativa do Instituto o que para tanto contribuiu as críticas a contratação de especialistas estrangeiros para novas seções criadas: a professora G. von Ubish para seção de Genética e à Química e Farmacobiologia com o contrato do prof. K. H. Slotta e drs. P. Koenig e G. Szyszka; e principalmente "J. B. Arantes, que não soube, infelizmente, continuar o regime de disciplina instituído no estabelecimento o que concorreu, não só para a intromissão de atividades partidárias em Butantan como para a eliminação do princípio fundamental do comando único na administração ... " pg. 5 Relat. Anual 1935 Instituto Butantan.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

Seção de Protozoologia e Parasitologia — Flávio da Fonseca prosseguiu suas pesquisas sobre acarianos (carrapatos) tendo descrito trinta e seis formas novas. Foram publicados quatorze trabalhos científicos (além de um de divulgação) sendo onze sobre acarianos de Flávio da Fonseca e um sobre carobinha, de Alcides Prado e W. Peckolt.

Seção de Imunologia e Soroterapia (J. B. Arantes) com as subseções soroterapia antivenenosa, antitóxica e antibacteriana. Produção científica de quatro trabalhos originais.

Seção de Bacteriologia e Bacterioterapia (S. de C. Calazans) produção científica quatro trabalhos.

Seção de Vírus e Virusterapia (Lemos Monteiro) com o anexo lab. Vacínico e o serviço de bacterina tuberculosa BCG. Aumento de produção de vacina antivariólica dado o recrudescimento da varíola em nosso meio. Produção científica quatro trabalhos.

Seção de Físico-química: quatro trabalhos científicos sobre a composição química de venenos ofídicos; análises diversas e pesquisas em especialidades.

Seção de Fisiopatologia Experimental (Tales Martins): quatro trabalhos científicos. As instalações desta seção ainda não foram completadas.

Seção de Botânica Médica (W. Peckolt). Como produção científica, além de artigos de divulgação na revista "Chácaras e Quintais", publicou dois trabalhos nas "Memórias".

— Seções novas:

Seção de Citoembriologia e Genética Experimental (Gestrudes von Ubisch, contratada na Alemanha) realizou trabalhos de seleção de aveia

e milho com fins de aumentar a produção de forragens para os animais do Instituto e realizou estudos sobre a hibridação de preás e cobaias, visando o problema futuro de fixação de uma raça de eqüinos boa produtora de antitoxina. No entanto, esses trabalhos estiveram prejudicados pela insuficiência de verbas.

— Foram contratados para a Seção de Química e Farmacobiologia, K. H. Slotta e G. Szyzka que trabalharam na instalação dos respectivos laboratórios, sendo aguardado material importado retido na Alfândega de Santos para o início das pesquisas. Entre estas se destacavam: estudo da composição e ação fisiológica do café sobre o organismo humanos, em colaboração com a seção de Fisiopatologia Experimental de acordo com entendimentos havidos com a presidência do Instituto do Café de São Paulo.

— Distribuição dos Serviços Técnicos:

Seção de Ofiologia e Zoologia Médica: Afrânio do Amaral.

Seção de Parasitologia e Protozoologia: Flávio da Fonseca e Alcides Prado — subseção de Parasitologia: Alcides Prado.

Seção de Imunologia Sorotepia: J. B. Arantes (não apresenta o relatório anual) subseção de soroterapia antitóxica: assistente estagiária Jandira Planet do Amaral, subseção de soroterapia antibacteriana: Joaquim Travassos.

Foram subdivididos os trabalhos desta seção: Paulo Artigas (contratado neste ano) serviço de preparo e estudo do soro e bacterina pneumocócica, soro e bacterina antipestosa e tuberculina: Jandira Planet do Amaral, preparo de anatoxinas e antitoxinas diftéricas e estafilocócicas: Joaquim Travassos soros e bacterinas antimeningocócica, gonocócica e estreptocócica e antitoxina e anatoxina escarlatínica.

Seção de Bacteriologia e Bacterioterapia: Sebastião Camargo Calazans. Subseção de anaeróbios (soros antitetânico e antigangrenoso) subseção de Bacterioterapia e serviços veterinários — Cícero Neiva, serviço de meios de cultura (anexo a seção de bacteriologia) o encarregado Pedro Ruiz Pacheco.

Seção de Vírus e Virusterapia (Lemos Monteiro que morreu em 6-11) foi substituído pelo assistente interino Raul Godinho e os auxiliares José Navas e Victor Salcedo J.º — subseção vacínico.

Seção de Físico-química Experimental: D. Klobusitzky

Seção de Fisiopatologia: Tales Martins.

Seção de Botânica Médica: W. Peckolt.

Seção de Genética Experimental: G. Ubisch.

— Apesar do aumento de verbas do Estado, houve decréscimo tanto na produção industrial, quanto da científica devido à crise interna do Instituto.

1936

— Em 23 de janeiro foi iniciada a sindicância para apurar as irregularidades acontecidas no ano anterior.

— Afrânio do Amaral solicitava o afastamento do cargo de diretor durante a duração da sindicância, que se estendeu até sete de novembro; foi substituído na superintendência interina, pelo Dr. J. Carvalho Lima e depois por Flávio da Fonseca. Com o resultado do inquérito, foram afastados do Instituto e adidos ao Serviço Sanitário três assistentes-chefes (J. B. Arantes, S. de Camargo Calazans e Waldemar Peckolt). Três assistentes (Raul Godinho, Alcides Prado e Cícero Neiva), o chefe de cocheira (Teófilo Martins), dois auxiliares técnicos (Tertuliano Beu e Domingos Yered) um servente (F. Corrêa). Foram designados para ocupar as seções, respectivamente, Flávio da Fonseca, Paulo Artigas, Gertrudes von Ubisch. Para serviços da cocheira, Pedro Ruiz e para o lugar de assistente-chefe, criado no orçamento de 1936 e ainda não preenchida a vaga a assistente Jandira Planet do Amaral (estagiária desde 1931). Foram abertos concursos para preenchimento dos cargos de auxiliares de escrita e serventes.

— A produção industrial do Instituto apresentava um déficit de 739:285$500.

— A produção de pesquisa científica sofre também decréscimo, trinta e seis trabalhos científicos constariam do X vol. das "Memórias".

— Poucas construções neste ano, restringindo-se à adaptação de algumas seções, à compra de dois tratores e implantando a instalação da Seção de Química Experimental com aparelhamento importado da Alemanha; ultimada a instalação de físico-química, com aquisição de aparelho para cataforese e eletrocondutividade e, na Fisiopatologia Experimental, a instalação de um grande oscilógrafo importado da Inglaterra.

— Foi realizado curso de extensão universitária de endocrinologia e outro sobre hormônios sexuais femininos e mecanismos do parto.

— Distribuição dos Serviços Técnicos (científicos):

Seção de Ofiologia e Zoologia Médica — decréscimo do recebimento de animais peçonhentos e a produção científica consistiu no Catálogo dos Ofídios do Brasil (segunda edição) impresso nas "Memórias".

Seção de Parasitologia e Protozoologia — Flávio da Fonseca — destacou-se em estudos sobre acarologia, entomologia, malariologia e protozoologia. Substituiu J. B. Arantes, vice-diretor, na seção de Imunologia Experimental e Soroterapia e ficou também à frente das Seções de Ofiologia e Zoologia Médica, Vírus e Virusterapia e do laboratório de Entomologia, quando do afastamento do diretor-superintendente e de algum assistente, chegando mesmo a se encarregar, durante este período de crise, do trabalho de seis diferentes serviços do Instituto.

— Seção de Imunologia e Soroterapia — (F. Fonseca) subseção de soroterapia antitóxica Jandira Planet.

— Seção de Bacteriologia e Bacterioterapia — Paulo Artigas — em caráter provisório até serem admitidos novos assistentes. Foi auxiliado por Benedictus Mourão e Ariosto Soreto, que se achavam em condições de serem admitidos como assistentes.

— Pequeno surto de peste.

— Seção de Vírus e Virusterapia sob direção de Joaquim Travassos, aprovado em concurso. Devido ao inquérito esteve afastado por três meses. Os trabalhos iniciados por Lemos Monteiro sobre tifo exantemático e febre maculosa foram interrompidos e perdido o material de pesquisa. O departamento de vacina jenneriana necessitava reformas. Pequeno surto de varíola em São Paulo. O Instituto forneceu 3.321.360 doses de vacinas.

Seção de Físico-química — Dr. D. Von Klobusitzky com o assistente P. Koloning — pesquisas sobre princípios ativos do veneno de jararaca e que resultou no preparo de um novo produto, "hemocoagulase", com indicação específica contra certas hemorragias.

Seção de Fisiopatologia Experimental — Tales Martins — foram ampliadas suas instalações.

Seção de Botânica Médica e Seção de Genética — G. von Ubisch — estudos sobre seleção de aveia e milho. Realizou também estudos sobre hibridização da cobaia com o preá, visando a verificação da capacidade de imunização desses dois animais contra anatoxina diftérica.

Seção de Química — K. H. Slotta — auxiliado pelo assistente G. Szyszka e K. Neisser realizaram trabalhos científicos e industriais sobre hormônios, sobre princípios ativos de venenos e sobre componentes do café. A seção foi favorecida por ter contado com apoio financeiro do Instituto do Café, constituindo suas instalações nas mais modernas da América Latina.

— Depois que reassumiu a Direção do Instituto, Afrânio do Amaral reintegrou a necessidade da criação de um hospital regional, a contratação de mais seis assistentes e ampliação das instalações do Instituto.

1937

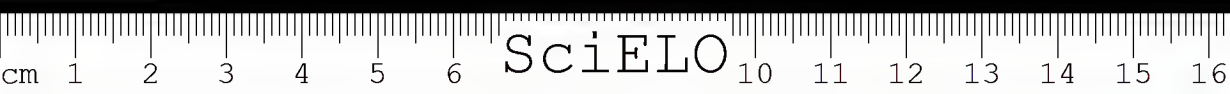
— Reorganização do Instituto desde a parte administrativa e econômico-financeira até a industrial e técnico-científica.

— Trabalhos de reparação e conservação dos cinqüenta e quatro prédios existentes no Butantan e adaptações em laboratórios e seções técnicas.

— Devido aos serviços de drenagem e fertilização do solo, houve aumento da produção agrícola, principalmente de forragens verdes para o sustento dos animais.

— O Instituto possuia uma das maiores criações de animais para experimentação, infra-estrutura básica para pleno desenvolvimento da Medicina Experimental.

O Instituto superava o déficit do ano anterior, chegando mesmo a ter um saldo positivo de 1.585:674$700.

— Foi sugerido pelo diretor superintendente, Afrânio do Amaral, que fosse concedido ao Instituto maior autonomia administrativa tornando-se uma autarquia, o que possibilitaria superar as dificuldades de ordem burocrática, resultando em maior saldo da produção industrial. "O simples fato de haver em 1931 o Instituto sido desanexado do

Serviço Sanitário e de ter então adquirido finalidades mais amplas, passando a dedicar-se de perto a trabalhos sobre medicina experimental no terreno da patologia humana, já foi o bastante para lhe desburocratizar em parte as normas administrativas", Amaral, Afrânio, Relatório 1937, pg. 3.

— Distribuição dos Serviços Técnicos (científicos):

Seção de Ofiologia e Zoologia Médica (Afrânio do Amaral) recebimento de 20.962 serpentes vivas; 3.528 batráquios; aranhas, escorpiões e centopéias 8.854, além de outros animais; carrapatos, barbeiros e outros insetos.

Produção de onze trabalhos científicos.

Seção de Parasitologia e Protozoologia — (Flávio da Fonseca) além dos trabalhos normalmente desenvolvidos na seção, colaborou com o Serviço Especial da Defesa contra a Febre Amarela, em pesquisas visando o problema dos reservatórios naturais de virus na selva. Foram elaborados seis trabalhos científicos.

Seção de Botânica Médica (M. Pirajá da Silva) além dos trabalhos normais de produção, estudos sobre a ecologia e a sistemática de diversas espécies de plantas Medicinais do gênero Jacaranda (carobinha) Paullinia (guaraná), Cephaelis (Ipecacuanha) e Theobroma (cacau). A seção recebeu por permuta semente e mudas de diversas plantas (101 remessas) e feita classificação de sessenta e um exemplares de plantas medicinais cultivadas no Horto Oswaldo Cruz.

Seção Citoembriologia e Genética (G. von Ubisch. A chefe da seção esteve por seis meses na Europa tendo sido substituída por Raul F. de Mello. Prosseguimento dos estudos sobre o cruzamento de cobaias e preás e trabalhos de seleção de plantas de interesse econômico (aveia e tremoço) e medicinal (mamão).

Seção de Vírus e Virusterapia (Joaquim Travassos) trabalhos experimentais sobre a etiopatogenia do "Tifo exantemático de São Paulo". Foram apresentados treze trabalhos à Sociedade de Biologia de São Paulo. No laboratório Vacínico anexo à Seção, foram preparadas 3.067.280 doses de vacinas jenneriana, sendo a metade desta produção enviada ao Serviço Sanitário para profilaxia da varíola em São Paulo.

Seção de Bacteriologia e Bacterioterapia (Paulo Artigas auxiliado por B. Mourão) trabalhos de preparo de substâncias biológicas; cinco trabalhos científicos.

Seção de Imunologia e Soroterapia (subseção de anaeróbios) Ariosto Buller Souto; encarregado dos serviços de soro antiperfringens, soro antisepticum, soro antioedematiens, soro antihistolyticum, soro anticolibacilar, soro e anatoxina antitetânica.

— Ariosto B. Souto trabalhava em bacteriologia e imunologia com Genésio Pacheco, no Rio de Janeiro, fez estágio no Instituto Bacteriológico de Buenos Aires e assumiu a direção da Seção de Anaeróbios em fevereiro de 1937. Trabalhos científicos: estudos sobre anatoxinas tetânicas, estudos hematológicos e experiências sobre vitaminas e toxinas gangrenosas, organização do novo museu de Culturas Anaeróbias.

OLIVEIRA, J. L. Cronologia do Instituto Butantan (1888-1981) 1.ª Parte. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*: 11-79, 1980/81.

Subseção aeróbios (Jandira Planet do Amaral) preparo das toxinas e anatoxinas diftérica, estafilocócica, e escarlatínica e das antitoxinas correspondentes; soro antiestreptocócico e as bacterinas estreptocócica, estafilocócica e piogênica.

Seção de Vírus e Virusterapia (J. Travassos) pesquisas sobre tifo exantemático de São Paulo tanto do problema do reservatório e depositários do tifo de São Paulo, como do transmissor ou transmissores. Foram apresentados na Sociedade de Biologia de São Paulo e em publicação no Comptes Rendus de la Societè de Biologie de Paris doze trabalhos científicos e outros três que seriam apresentados no ano seguinte. O departamento de vacina jenneriana necessitava de reformas para melhor andamento de seus trabalhos; foram rebatidas as acusações do Serviço Sanitário sobre a qualidade dos produtos. Coube ainda a esta seção a preparação da vacina antiamarílica, cujo início dos trabalhos se daria em 1938 quando a seção estivesse devidamente aparelhada. Foram preparadas na seção 2.794 doses de vacina BCG.

Seção de Fisiopatologia experimental subseção de histologia patológica — (Moacyr Amorim). Esta seção foi criada neste ano em 06-02 e iniciados os serviços de organização e implantação de infra-estrutura para seu pleno funcionamento. Já recebeu material de pesquisas de outras seções e/ou de controle diagnóstico.

Seção de Genética Experimental (Gertrud von Ubisch) com a colaboração de Jandira Planet do Amaral estudos sobre imunização de cobaias e preás com anatoxina diftérica e pesquisas sobre cultura de aveia e sobre sexo de mamões, e tremoço. A chefe da seção esteve afastada até mês de dezembro por motivo de saúde, sendo substituída por Raul Franco de Mello.

Seção de Botânica Médica (Manoel A. Pirajá da Silva) realizou excursão científica à Bahia e trabalho de classificação das plantas no Horto O. Cruz.

Seção de Fisiopatologia (Thales Martins) com o assistente J. Ribeiro do Valle, estudos sobre hormônios sexuais. Foram publicados seis trabalhos científicos.

Seção de Físico-Química (Dionísio von Klobusitzky), assistente Paulo Konig; serviços de dosagens eletrométricas e colorimétricas de pH, exames químicos e bioquímicos de produtos; experiências sobre a concentração de soros curativos por meio de corrente contínua. Foram realizados nesta seção, pioneiramente, trabalhos sobre eletroforese em papel. Participação de D. Klobusitzky no Congresso Sul-Americano de Química, realizado no Rio de Janeiro, onde foram apresentados seis trabalhos. Em andamento pesquisas sobre o veneno do gênero Bothrops sobre as propriedades das proteínas em presença do álcool.

Seção de Química (Carlos Slotta), assistente João Szyszka e Cláudio Neisser. Foram aumentadas as instalações da seção, seu aparelhamento e pessoal. O Estado cobre metade das despesas, cabendo o restante ao Instituto do Café.

— Realizaram pesquisas sobre venenos de sapos, hormônios sexuais e pesquisas sobre a química do café, seu aproveitamento e propaganda científica.

1938

Afrânio do Amaral foi substituído na direção do Instituto Butantan por José Bernardino Arantes. Pelo decreto 9.437 de 22-8-38 foi criado o Serviço do Laboratório da Saúde Pública compreendido pelos Institutos Butantan, Pasteur e Bacteriológico, de forma a possibilitar vantagens de ordem científica e econômica, além de um intercâmbio entre eles e a possibilidade de melhor distribuição de atribuições de cada um.

— Jayme Cavalcanti acumulou os cargos de diretor do Serviço de Laboratórios de Saúde Pública e da direção do Instituto Butantan, auxiliado pelos assistentes-médicos da Diretoria: José Dutra de Oliveira e Renato Fonseca Rodrigues.

— Crise administrativa fruto da gestão anterior: "Caso Simaco" e o da Light.

— "Caso Simaco", firma que explorava ilegalmente em terrenos do Instituto a indústria de olaria e extração de areia com prejuízos para o Estado.

— Acordo desvantajoso para o Estado pela Light para cessão dos terrenos marginais ao rio Pinheiros para serviços de canalização.

— Modificações introduzidas:

a) criação da Seção de Exames Sanitários e Químicos. Dentre suas finalidades o combate à falsificação de produtos medicamentosos.

b) criação da Seção de Peste, fazendo a parte do laboratório em cooperação com o Serviço de Epidemiologia e Profilaxia Gerais;

c) instalação da Seção de Medicina Experimental, transferida da Faculdade de Medicina para o pavilhão do Instituto especialmente adaptado;

d) melhorias nos vários laboratórios, remodelação da rede telefônica interna; e estudos para plano geral de remodelação do Instituto, incluindo a parte técnica e turística.

— Os relatórios de atividades do Instituto Bacteriológico e Pasteur estão incluídos neste Relatório Anual dos Laboratórios da Saúde Pública. A direção do Bacteriológico ficou a cargo do J. P. Carvalho Lima e do Instituto Pasteur, Eduardo Rodrigues Alves. O Bacteriológico também em crise: precariedàde do prédio e instalações. Problemas referentes à carreira dos assistentes e remuneração. Instituto Pasteur continuava normalmente nos serviços de debelação e profilaxia do vírus da raiva.

— Distribuição dos trabalhos técnicos I.B.:

Seção de Parasitologia e Protozoologia: (Flávio da Fonseca) foi incumbida do preparo da vacina BCG; atendimento de consultas técnicas e pedidos de material (permuta). Até meados do ano foram realizadas pesquisas sobre a febre amarela silvestre, que depois passaram a ser de responsabilidade da Comissão Rockefeller (R.J.). As pesquisas sobre acareologia prosseguiam: descrição de uma espécie hematófaga, capaz de parasitar o homem, descrição de um gênero e onze novas espécies. Foram entregues dezesseis trabalhos científicos para publicação.

Seção de Ofiologia e Zoologia Médica: (Alcides Prado) acréscimo na coleção de ofídios, trabalhos de conservação da coleção. Devolveu-se ao

Museu Paulista, a coleção de ofídios e sáurios que desde 12-12-31 estava no Butantan por empréstimo. Foi contratado novo assistente auxiliar, o biologista Otto Wolfgang Burcherl, que estudaria principalmente os grupos dos sáurios e chilópodos.

Seção de Soros Antitóxicos (Jandira Planet do Amaral) encarregada da seção do mês de janeiro a abril. Preparo das toxinas e anatoxinas diftéricas, estafilocócica e escarlatínica e das antitoxinas correspondentes; soro antiestreptocócico e bacterinas estreptocócica, estafilocócica e piogênica. Depois, a seção passou a ser designada como imunologia.

Seção Soroterapia antidisentérica (Paulo Monteiro de Barros Marrey) nomeado em 2-9-38 para o cargo de assistente-chefe. Havia trabalhado anteriormente no Instituto tendo se retirado espontaneamente em 3-9-1930. Foi encarregado do preparo de soro antidisentérico até então a cargo de Cícero Neiva. Dificuldade técnica: falta material de laboratório, falta de estirpes dos diversos tipos de bacilo disentérico para preparo dos antígenos. A imunização dos animais só se iniciou em dezembro.

Seção de Anaeróbios Ariosto Büller Souto (1-1-38 a 15-5-38) encarregado dos serviços de: soros antiperfringens, antioedematiem, antivibrião-séptico, anti-histolítico, antitetânico, anticolibacilar e anatoxina tetânica; oito trabalhos científicos; recebimento de amostras de anaeróbios de laboratório estrangeiro.

Seção de Preparo dos Soros Antipeçonhentos (J. B. Arantes).

Seção de Fisiopatologia (Thales Martins) vinte e três trabalhos científicos com o assistente J. R. Valle e estagiário Ananias Porto. Participação no Primeiro Congresso Pan-Americano de Endocrinologia (RJ). Convites para visitas ao estrangeiro: Montevidéu, Buenos Aires e Londres. Com a supressão da subvenção do Instituto do Café e da desarticulação da Seção de Química Orgânica foram interrompidos os trabalhos.

Seção de Vírus e Virusterapia (J. Travassos) trabalhos de pesquisa sobre tifo de São Paulo. Desde 1936 desavença entre Raul Braga Godinho, que perdeu o cargo em concurso para Joaquim Travassos, e depois exercendo alto cargo no Departamento de Saúde difamou a seção. No período de 37-38 foram publicados vinte e seis trabalhos. Esta seção ficou encarregada do fabrico dos soros e bacterianas antimeningocócica e gonocócica, cultura de tecidos e estudos de vírus. O serviço de BCG foi transferido para outra seção e o Serviço de Febre Amarela, que não chegou a utilizar as novas instalações especialmente feitas, sendo transferido o Serviço para a Rockefeller Foundation (RJ). 10-5 reassumiu Cícero Neiva a Seção de Vírus Vacínico (soro antidisentérico e antitífico; bacterinas "per os"; típico-paratífica, disentérica, disentérica mista e tífico-paratífico — disentérica e bacterinas injetáveis, anatoxina, diftérica; filtrados estafilocócico, estreptocócico e antipiogênico. O serviço de vacina BCG passou para o assistente A. B. Souto. Em trinta de setembro assumiu a seção de Vírus Vacínico que estava sob a responsabilidade do técnico José Navas.

Seção de Química (Armando Taborda) prosseguimento das pesquisas iniciadas: veneno de sapos, hormônios sexuais, análises das propriedades químicas e fisiológicas do café e estudos dos venenos ofídicos relativos ao

conhecimento da constituição das proteínas tóxicas. Era intenção de Taborda formar especialista em química orgânica e bioquímica moderna, Serviço de Controle PH e outros exames químicos.

— As seções de Físico-química e Química e Farmacologia experimentais, com os respectivos assistentes-chefes Klobusitzky e Slota — formavam corpo técnico de vinte e três pessoas, que após as mudanças do Governo e Diretoria (6-5-38) foram sendo reduzidos até ficarem apenas oito (saída dos assistentes estrangeiros em julho). Foi subordinada à seção o Serviço de Concentração de Soros (técnico José Salcedo Navarro) em novas e higiênicas instalações.

— Apesar da sugestão de Taborda para criação da Seção de Química Imunológica, esta orientação não foi seguida pela reforma de 23-8 tendo sido incrustada na Seção de Química, uma outra: exames Sanitários e Químicos e exame Sistemático de Águas Minerais e Medicinais do Estado.

— Em 1937 foi feito contrato com a firma Delpech e Cia. Ltda. para venda exclusiva dos produtos do Instituto Butantan no Brasil e no estrangeiro. Em 7-3-1938 foi renovado o contrato onde em uma das cláusulas concedia ao agente depositário, o desconto imediato de 40% sobre o valor de fatura, o que deixava em desvantagem o Instituto.

— Quadro geral dos assistentes do Instituto: nove assistente-chefes: Dr. Alcides Prado, Dr. Cícero de Moura Neiva, Dr. Flávio O. R. da Fonseca, Dr. Moacyr de Freitas Amorim, Dr. Paulo Monteiro de Barros Marrey, Dr. Joaquim Travassos da Rosa, Dr. José Bernardino Arantes, Dr. Thales Martins, Dr. Sebastião de Camargo Calazans.

— Oito assistentes: Dr. Armando Taborda, Dr. Fernando Paes de Barros, Dr. Ariosto Büller Souto, Dra. Jandira Planet do Amaral, Dr. Paulo Rath de Souza, Dr. José Ribeiro do Valle, Dr. Aristides Vallejo Freire, Dr. Leônidas de Toledo Piza.

— Seis assistentes-auxiliares; Dr. Domingos Yered, Dr. Favorino Prado Júnior, Dr. Wolfgang Bucherll, Dr. Ananias Porto, Dr. Goswin Karmann.

— Um assistente-químico: Dr. Antonio de Salles Teixeira.

— Assistentes novos indicados em 1938: Dr. Aristides Vallejo Freire, Dr. Ariosto Büller Souto, Dr. José Ribeiro do Valle, Dra. Jandira Planet do Amaral, Dr. Paulo Rath de Souza, Dr. Leônidas de Toledo Piza.

— Assistentes-auxiliares: Dr. Ananias Porto, Dr. Favorino Prado Júnior, Dr. Wolfgang Bucherll, Dr. Domingos Yered.

1939

— Diretor do Instituto Butantan: Jaime Cavalcanti; Diretor-Geral do Departamento de Saúde: Humberto Pasquale.

— Superação da crise administrativa:

Reaparelhamento dos laboratórios e remodelação das instalações de diversas seções, dentre elas as de Concentração de Soros, Distribuição de Produtos e Controle de Esterilidade. Para tanto foi formada uma comissão composta por Flávio da Fonseca (IB), José Dutra de Oliveira (Diretoria do Serviço de Laboratório) e José de Toledo Mello (Faculdade de Medi-

cina) ; foi construído um grande tanque de diálise e uma nova câmara frigorífica para estoque de produtos.

Foram também reformadas as seções de Vírus Vacínico, seção de Vírus e Virusterapia, dotando-a de aparelhamento para estudo e preparo da vacina de febre maculosa, de forma a assegurar-se contra riscos de contaminação daqueles que lá trabalhavam.

Foi estimada uma verba necessária de 2.600:00$000 para atender as reformas: Seções de difteria, tipo exantemático e peste; serviço de gás e construção da cocheira geral e por último, melhorar instalação da diretoria, administração, museu, biblioteca etc.

Foi concedida verba de 700:000$000 e graças a esse crédito foi iniciada a construção do novo pavilhão de laboratórios, cujas obras foram confiadas à firma construtora Francisco Azevedo e Palma Travassos.

Foi retomado o programa do Instituto, isto é, produção de substâncias biológicas para combate de doenças infecto-contagiosas e acidentes por envenenamento de origem animal, distribuídas pelo Departamento de Saúde do Estado, permuta com os lavradores e o restante vendido através dos representantes comerciais.

Aumento da produção industrial com relação ao ano anterior na ordem de 361:183$600.

Apesar do cultivo de grandes áreas foi sugestão do Estado a aquisição de mais terras, no interior, para criação de um tipo-padrão de cavalo doador de sangue.

Intensificação da campanha para envio de animais peçonhentos do Instituto, tendo concorrido para tanto a propaganda pelo rádio.

— Distribuição dos trabalhos técnicos — Divisão I — Produção:

a) Seção de Ofiologia (J.B. Arantes) soro antipeçonhentos, anavenenos.

b) Seção de Imunologia Experimental e Soroterapia (Jandira Planet do Amaral) : toxinas (diftérica, estafilocócica, escarlatínica, estreptocócica) anatoxinas e soros (diftérica, estafilocócico, escarlatínico, estreptocócico e pneumocócico tipos I e II) e vacinas (estafilocócica, estreptocócica, piogênica e pneumocócica).

c) Seção de Anaeróbios (Ariosto Buller Souto). Até junho de 1939 abrangia os seguintes serviços: Soro antipestoso; controle, Museu de Cultura; Soro antitífico; Soro anticolibacilar; Soro antitetânico; Tuberculina; Soro antiperfringens; Soro antioedematiens; Soro anti-histolítico; Vacinas antitíficas, antidisentéricas e antitíficas-disentéricas orais e injetáveis, serviço de antivírus tífico-paratífico, serviço de vacinas antipestosa e antitetânica, instalação e funcionamento de S. Controle peste murina (profilaxia da peste).

Com o aumento do pessoal técnico foram divididos os serviços desta seção da seguinte forma:

José C.B. Ribas: produção de vacinas e soros antipestosos e controle da peste murina.

J.S. Leme: produção de soros e vacinas coli-tífico-disentéricos, produção de tuberculina e de Museu de Culturas.

Graças ao serviço de controle de peste murina foi detectado e debelado o foco de peste bubônica na Av. Água Branca, onde foram mortos mais de 3.000 ratos e evitando surto epidêmico de graves conseqüências, dada a forte concentração de operários na região. Vários fatores pertubaram as seqüências dos trabalhos desta seção: a brusca transferência do preparo do BCG e o inquérito administrativo contra quase a totalidade dos assistentes do Instituto; em decorrência da guerra na Europa, dificuldades para o recebimento dos soros-padrões antitetânico e antigangrenoso que passaram a ser enviados pelo "National Institute of Health" de Washington.

d) Seção Vírus Vacínico (Cícero Neiva).

e) Seção de Vírus (febre maculosa) (Joaquim Travassos da Rosa e o assistente A. Vallejo Freire) estudo experimental da febre maculosa e preparo da vacina preventiva tipo Spencer-Parker; preparo do soro antimeningocócico e das vacinas antimeningocócica e antigonocócica; controle da seção de distribuição, filtração e esterilização; controle da esterilidade dos produtos do Instituto.

Os serviços da seção estiveram prejudicados no ano anterior e primeiro semestre deste ano por causa do inquérito administrativo; com o afastamento do assistente-chefe, foram interrompidas as pesquisas sobre a febre maculosa de São Paulo.

O resultado do inquérito levou a seu arquivamento e autorizou os implicados a reassumirem os seus cargos e a conseqüente retomada das pesquisas iniciadas. Foram realizadas reuniões semanais inicialmente com pesquisadores e técnicos da seção e depois ampliadas, com fins de divulgação de conhecimento científico.

f) Seção de Bacteriologia (José C. Bulcão Ribas) soros antimicrobianos; antimeningocócico, antipestoso e vacinas antimeningocócica, pestosa e gonocócica.

g) Seção de Colitifo-disentérico. (2.º semestre) José Sizenando de Macedo Leme, segundo assistente da cadeira de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da USP, em comissão no Instituto Butantan. Se encarregou dos preparos dos produtos: tuberculina, soro antífico, soro anticolibacilar e Museu de Cultura.

h) Seção de Físico-química — concentração (Armando Taborda). Esta seção contou com o auxílio da assistente, auxiliar, química Laura Taborda. Foram realizados os controles de proteínas nos soros, dosagem microquímicas de nitrogênio e análises microquímicas em geral, trabalhos em colaboração sobre os venenos de cobras, além dos trabalhos de concentração e acondicionamento. Apesar da saída dos técnicos estrangeiros, da supressão da subvenção do Instituto do Café, da insuficiente instalação da seção e diminuição do pessoal técnico foi possível prosseguir os trabalhos atribuídos à seção.

i) Seção de Controle (Plínio Martins Rodrigues) iniciada em novembro, para fins de estabelecer uma técnica para controle de esterilidade dos produtos.

j) Seção de Botânica Médica (Fernando Paes de Barros) falta de laboratórios para pesquisas e falta de pessoal. O Horto Oswaldo Cruz

tem sofrido depredações. A tintura de carobinha, único produto da seção, logo teria que ser adquirido fora, devido à devastação das carobinhas existentes.

— Divisão II — Pesquisa:

a) Seção de Ofiologia (II) Zoologia Médica (Alcides Prado) recebeu ofídios por intercâmbio científico do Prof. Samuel Pessoal (Amazonas), Venezuela, produziu sete trabalhos científicos.

b) Seção de Ofiologia III (Wolfgang Bucher) estudos sobre os quilópodos da América do Sul, além de três trabalhos científicos publicados em revistas especializadas, estava no prelo um trabalho completo (300 pág.) sobre "Os Quilópodos do Brasil".

c) Seção de Fisiologia (Thales Martins assistente J. R. Valle) onze trabalhos publicados.

d) Seção de Parasitologia e Protozoologia (Flávio da Fonseca) além dos trabalhos próprios da seção, acumulou trabalhos relativos à produção do Instituto e aqueles realizados no Serviço de Profilaxia da Malária do Departamento de Saúde do Estado. Trabalhos relativos à coleção parasitológica e pesquisas de acareologia, protozoologia e helmintologia. Foram publicados dezoito trabalhos científicos. Encarregou-se da produção BCG.

e) Seção de Química e Farmacologia Experimentais (Laura Taborda) faltava aparelhagem adequada à seção; realizava dosagem de Nitrogênio e pesquisas sobre venenos em colaboração com a seção de físico-química.

f) Seção de Química Analítica (Leônidas de Toledo Piza) seção nova — necessidade de aparelhamento da seção. Já se encontrando amostras de trinta e oito produtos farmacêuticos para análise de fiscalização. O prof. Toledo Piza foi comissionado para assumir a cadeira de Química Analítica da Escola Politécnica, assumindo Gowin Karmann. Foram atendidas solicitações de outras seções: aferição material, preparo de soluções tituladas etc. Em outubro, reassumindo Toledo Piza, foram reiniciados os trabalhos de fiscalização de produtos e trabalhos da Seção de Meios de Cultura.

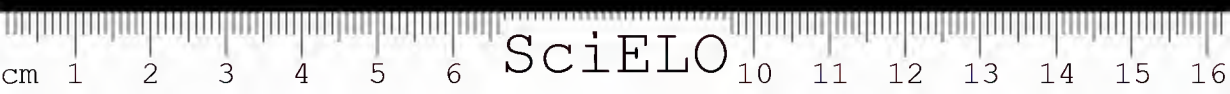
g) Seção de Medicina Experimental (Anatomia patológica) Barata Ribeiro. Dentre os vinte e um trabalhos experimentais da seção destacavam-se: "Contribuição ao Estudo da Semiologia e Patologia do Pâncreas Exócrimo", pesquisas sobre tumores em ratos, pesquisas de Euríclides de Jesus Zerbini e Moacyr Hoclz "Influência da Hipoavitaminose nos processos de cicatrização", trabalhos de biópsias em animais.

— A seção ainda estava incompleta em suas instalações.

1940

4-1 Ademar de Barros, interventor do Estado, presidiu ao lançamento da pedra fundamental do novo prédio destinado aos laboratórios de bacteriologia.

— Reformas e ampliações das instalações já existentes, dentre elas, as seções de Vacina Jenneriana, seção de Vírus e Virusterapia (princi-

palmente visando o aumento de produção da vacina preventiva contra a febre maculosa), Seção de Anaeróbios, Parasitologia e de Controle de Esterilidade, a Seção de Difteria e Soros Antitóxicos em geral (profilaxia e terapêutica de moléstias infecciosas como a pneumonia, difteria, escarlatina, tifo e outras) habilitando-as a grandes campanhas sanitárias. A seção Industrial, as seções de concentração, distribuição e Meios de Culturas tiveram remodelação geral em suas instalações, objetivando o aumento da produção e a qualidade dos produtos.

— Foi criada a Seção de Endocrinologia pelo decreto 11.032 de 16-4 e inaugurada em 30-7 por Ademar de Barros. Ela constituiu-se na ampliação da extinta Seção de Fisiopatologia (criada em 1934) e manteve em funcionamento duas subseções: a parte experimental no Butantan e parte clínica, instalada no Centro de Saúde de Santa Cecília.

— Melhoramentos nos parques, pintura dos prédios tornando o Instituto um local agradável, também no aspecto turístico. Obtenção de um guarda civil poliglota para atender turistas estrangeiros. E estava em plano a construção de bar-restaurante para atender funcionários e visitantes.

— Pelo decreto 11.032 de 16-04-40 foi extinta a Seção de Medicina Experimental, que por transferência da Faculdade de Medicina, vinha funcionando no Instituto Butantan desde 13-12-38.

— Pelo decreto 11.522 de 26-10-40 foi extinta a Diretoria do Serviço de Laboratório de Saúde Pública e desta forma o Butantan torna-se dependente direto do Departamento de Saúde.

— Jayme Cavalcanti continuou como Diretor comissionado do Butantan.

— O valor da produção industrial aumentou atingindo a cifra de 1.923:143$100 referentes a nove meses, posto que a produção esteve por três meses paralisada em função das reformas acima referidas.

— Seções técnicas em funcionamento em 1940:

Ofiologia e Zoologia Médica (Alcides Prado e Wolfgang Bucherl).

Imunologia e Soroterapia Antivenenosas (José Bernardino Arantes).

Vacina Jenneriana (Cícero Neiva, Domingos Yered).

Imunologia e Soroterapia Antitoxinas e Antibacterianas os assistentes-chefes Sebastião Calazans em comissão no Instituto Adolfo Lutz e Paulo Marrey comissionado junto ao Serviço de Policiamento da Alimentação Pública, respondendo pela Seção, a assistente Jandira Planet do Amaral, auxiliada por mais três assistentes: Bulcão Ribas, Macedo Leme e Celso Brandão. Nova redistribuição dos encargos técnicos, a saber: preparo das toxinas e anatoxinas diftérica, estafilocócica, estreptocócica e escarlatínica; soros diftérico, estafilocócico, estreptocócico, escarlatínico e pneumocócico tipos I e II; vacinas estafilocócica, estreptocócica, piogênica e pneumocócica e serviços anexos: seção de meios de cultura, esterilização e sangria.

Seção de Anaeróbios que funcionou até o final do ano sob a responsabilidade do assistente-chefe Ariosto Buller Souto, que então solicitou transferência para o Instituto Adolfo Lutz.

Seção de Vírus e Virusterapia (J. Travassos da Rosa e assistente A. Vallejo Freire) grande incremento da fabricação de vacina contra febre maculosa, muito solicitada pelo Serviço de Saúde, além de palestras científicas, trabalhos publicados (3) sobre febre maculosa, ampliação de gama de pesquisas, como por exemplo, o tracoma e outras moléstias de vírus, que podem atingir o homem. Foram realizadas viagens pelo interio do Estado com o fim de vacinação e instrução aos Médicos da região, apenso a esta seção ficava também o serviço de Diagnóstico de Peste Murina, responsável J. C. Ribas; em colaboração com a Seção de Epidemiologia e Profilaxia Gerais do Departamento de Saúde. O preparo dos produtos: vacinas e soros antimeningocócico, antigonocócico, antipestoso e Museu de Culturas; subseção "coli-tifo-disentérica"; subordinada à Seção de Imunologia e Soroterapia, a cargo de José Sizenando de Macedo Leme, o preparo dos produtos: tuberculina, bucovacinas (tífico-paratífico-disentérica) e vacinas injetáveis e soros antidisentéricos. Foram suspensas a fabricação dos soros antitífico e soro anticolibacilar, por falta de infra-estrutura técnica e pessoal insuficiente.

Seção de Química: o assistente responsável pela seção Leônidas de Toledo Piza foi comissionado junto à Escola Politécnica, substituído por Armando Taborda. Além das melhoras na assepsia e aumento do produto, a seção prosseguiu estudos sobre venenos de cobra, especialmente na parte enzimática, responsável pela ação proteolítica e outros estudos.

Seção de Controle de Esterilidade; (Favorino Prado Jr. assistente--auxiliar) os produtos foram submetidos a exames: culturas de meios, exame bacterioscópico e inoculação subcutânea em cobaias. Quanto a pesquisas, estudos sobre tuberculose e participação no Segundo Congresso Nacional de Hidroclimatismo (RJ) onde foram apresentados dez estudos relativos a águas minerais do Brasil.

Seção de Botânica Médica (Fernando Paes de Barros) falta de condições materiais para pesquisa e o Horto estava em estado precário.

Seção de Endocrinologia: O responsável pela seção Tales Martins voltou para Manguinhos, respondendo pela seção José Ribeiro do Valle. Tiveram mais sessenta trabalhos científicos publicados, dois trabalhos apresentados na sociedade de Biologia de São Paulo e prosseguimento dos estudos hormonais, além de manter intenso intercâmbio científico, com entidades congêneres estrangeiras e início da organização de um museu de peças anatômicas de interesse endocrinológico, além dos atendimentos na parte clínica no ambulatório especialmente criado.

Seção de Parasitologia (Flávio O. Ribeiro da Fonseca) colaboração com o serviço de Profilaxia da Malária em Guarujá, organização da coleção parasitológica e organização de um Museu Parasitológico, estudos sobre protozoários parasitas, estudos sobre Depteros parasitas, descrição de novos acarianos e produção da vacina BCG. A seção entregou dez trabalhos científicos para publicação.

1941

— Em 26 de junho, Flávio da Fonseca assumiu a direção do Instituto Butantan.

— O Instituto readquiriu sua autonomia administrativa, estando subordinada então, à Diretoria Geral do Departamento de Saúde.

— Medidas disciplinares visando regulamentação dos serviços; suspensão de vendas de leite e legumes a funcionários externos do Instituto, suspensão da indústria de venda de peles de ofídios e de fotografias etc.

— A seção de Ofiologia que cuidava da correspondência com os fornecedores foi transformada em Seção de Expediente.

— O contrato comercial para a representação dos produtos do Instituto Butantan com a firma Carlos Amaral foi prorrogado por mais cinco anos.

— Contrato com a Cia. Antárctica para exploração do serviço de restaurante, que foi inaugurado a 15 de fevereiro.

— Em face da situação internacional, foi aumentado o estoque de matéria-prima para atender a possíveis necessidades extraordinárias do País. Aumento da produção de antitoxinas tetânicas e gangrenosas e de vacinas tífico-paratífico-disentéricas.

— A convite do Reitor da Universidade do Brasil, Raul Leitão da Cunha, o Instituto representado por J. H. Travassos e Armando Taborda, na visita a Buenos Aires, dos Universitários do Brasil.

— Proposta de reforma Técnica e Administrativa do Instituto por Flávio da Fonseca: criação de curso de especialização como atividade cultural anexa à Universidade; criação de pequeno Hospital; desenvolvimento da seção do Museu; aumento de verbas para Biblioteca. Na parte técnica: redivisão das atuais seções, criação dos laboratórios de Imunologia Experimental, Micologia, de Biologia de Ofídios e de Quimioterapia (Química Orgânica) dando autonomia à seção de Anatomia Patológica e ao Laboratório de Tifo Exantemático e transformação da seção de Botânica Médica, em Farmacologia, ampliando-lhe o campo de ação.

— Separação das seções técnicas da função industrial e de produção científica, visando maior produção nas áreas.

— Previsão de criação do serviço de Veterinária, maiores facilidades de viagens para os assistentes, aumento do número de técnicos, aumento de verbas para aquisição de material de laboratórios, aumento permuta de ofídios.

— "Por determinação governamental acha-se em estudo o plano da instalação da cidade Universitária em terras do Instituto Butantan, aproveitada para esse fim a área hoje utilizada para culturas, piquetes, indo desde o Ribeirão Jaguaré até próximo do aqueduto de Cotia, para o que foi promulgado o decreto n.º 12.401 de 16 de dezembro de 1941", página 10 do Relatório Anual.

— Foi autorizada, verbalmente pelo Governo do Estado a escolha de uma fazenda, a uma distância não maior de 4 horas de viagem, à margem da Estrada de Ferro da Sorocabana, para ressarcimento das terras doadas e para o desenvolvimento da criação de eqüinos, bovinos e agricultura.

— Denúncia falsa sobre nocividade da tuberculina fabricada no Butantan.

— Desequilíbrio financeiro do Butantan apesar do aumento da produção industrial.

— Grande atenção à seção de concentração de soros, pois depende do bom funcionamento desta seção, o rendimento final de produção, daí melhorias introduzidas tanto no aspecto técnico, como na aquisição de aparelhagem.

— Ampliação dos biotérios de cobaias e coelhos e organização do biotério de macacos reshus para pesquisas sobre vírus de febre amarela, poliomielite e outros.

— Flávio da Fonseca organizou cursos de aperfeiçoamento em Bacteriologia, Imunologia, Parasitologia e Animais Venenosos.

— Dada à situação internacional, foi iniciado estudo para possível preparo de plasmas secos, para transfusão de sangue.

— Funcionamento de um laboratório provisório para estudo sobre febre maculosa em Loreto (surto na região).

— Publicação de quarenta e nove trabalhos científicos, destacando-se a seção de Endocrinologia, com dezoito trabalhos.

— Distribuição Técnica dos Serviços:

Laboratório de Soros Antivenenosos, Seção de Imunologia e Soroterapia — J. B. Arantes.

Seção de Imunologia Experimental e Soroterapia: preparação das toxinas, anatoxinas, soros, vacinas e serviços anexos (seção de meios de culturas, sangria e esterilização e de 20-1 a 20-9 os serviços da seção de anaeróbios — Jandyra Planet do Amaral).

Seção de Anaeróbios — Sebastião de C. Calazans esteve de licença de janeiro a setembro e novamente em dezembro; foi substituído na chefia de seção por Jandyra Planet do Amaral que teve como assistente Reynaldo Furlanetto.

Seção de Vírus Vacínico — Cícero Neiva.

Seção de Vírus — J. Travassos (preparo da vacina contra a febre maculosa e pesquisas para produção de soros anti-Rickettsia.

Seção de Bacteriologia e Serviço de Diagnóstico de Peste Murina — J. C. Ribas.

Seção "Coli-Tifo-Disentérica" — J. S. Macedo Leme.

Seção de Física-Química (Armando Taborda) — pesquisas sobre veneno bothrops e pesquisas referente a Concentração de Soros. Visita ao Instituto Bacteriológico de Buenos Aires e outros congêneres. Fusão das seções de Química, antes divididas em Química e Farmacologia, à de Físico-Química.

Seção de Controle (Plínio Martins Rodrigues).

Seção de Botânica Médica (Fernando Paes de Barros). Não foi provido de laboratório auxiliar para manutenção do Horto; daí seu quase completo abandono.

Seção de Ofiologia e Zoologia Médica (Alcides Prado) e Wolfgang Bucherl. O estudante de Medicina Paulo Emílio Vanzolini foi estagiário da seção.

OLIVEIRA, J. L. Cronologia do Instituto Butantan (1888-1981) 1.ª Parte. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45: 11-79, 1980/81.

Seção de Parasitologia (Flávio da Fonseca) além de trabalhos de produção e pesquisa em conjunto com outras seções do Instituto, colaborou com o Serviço de Profilaxia da Malária e Seção de Tuberculose, ambos do Departamento dependência direta da Saúde.

Seção de Águas Minerais — devolução do aparelhamento para Instituto Adolfo Lutz (Antonio de Salles Teixeira).

Seção de Endocrinologia (J. Ribeiro do Valle e Paulo Rath de Souza) participação no Segundo Congresso Panamericano de Endocrinologia em Montevidéu e visita a Buenos Aires; realização de cursos e intercâmbio científico.

1942

— O Instituto Butantan recuperou sua autonomia administrativa, passando a ser dependente direto da Secretaria de Estado dos Negócios da Educação e Saúde Pública pelo decreto 12.787, de 30 de junho de 1942, deixando a tutela do Departamento de Saúde, a que estava subordinado desde a criação da Diretoria de Laboratório de Saúde Pública.

— O Instituto Butantan sofreu reflexos da guerra, pois foram cortadas as importações de material de laboratório e o existente no mercado, sofreu conseqüente encarecimento. Mas, apesar das dificuldades, conseguiu bater recordes de produção visando atender às Forças Armadas e/ou populações civis dos produtos biológicos necessários. Na área de pesquisas no campo da patologia humana, foram produzidos vinte e quatro trabalhos originais a serem publicados no tomo XVI das Memórias, além de vinte e um trabalhos publicados em outras revistas especializadas.

— Dentre as pesquisas em curso, destacou-se aquelas desenvolvidas nas Seções de Química e Físico-Química, com a colaboração da Bacteriologia, sobre a "Penicilina". Estão sendo ultimados os preparativos para produção de plasma seco em escala industrial, estimando-se a produção em 1.200 unidades mensais, isto é, podendo manipular 250 litros de plasma humano, possibilitando assim o transporte de plasma seco para transfusões a longas distâncias. Outra pesquisa em curso, de destaque, foi para obtenção de um soro ativo contra o tifo Exantemático e as de uma nova técnica de obtenção da vacina contra a mesma infecção por Joaquim Travassos da Rosa, utilizando vírus cultivado em embriões de galinha. Também estavam sendo desenvolvidos trabalhos de isolamento e cristalização de flávina de venenos ofídicos, nas seções de Química e Físico-química.

— Foram realizadas dezesseis conferências, aulas e comunicações em sociedades científicas e cinqüenta reuniões internas, para comunicação e discussão de bibliografia.

— Medidas para incremento de produção de medicamentos: nova aparelhagem para maior rendimento de produção de soros, suspensão de férias dos funcionários, racionalização do estoque de matérias-primas, que resultaram na produção de 2.199.389 unidades de medicamentos diversos no valor de Cr$ 3.010.479,00 (cruzeiros antigos).

— Foi entregue um anteprojeto de Decreto-lei para reformas do Instituto, sugeridas no ano anterior, destacando-se: dissociação das atividades industriais das pesquisas; autonomia financeira em relação às

rendas próprias; organização de um Curso de Aperfeiçoamento, para candidatos a assistentes; estabelecimento de um Serviço Hospitalar, para uso das seções.

— Apesar da paralização de muitas obras dentro do Butantan em função da guerra, foram ampliadas as instalações do biotério para criação de cobaias, que teve sua produção quintuplicada; foi iniciada a construção do biotério de camondongos.

— O Serviço Federal de Febre Amarela, que vinha funcionando desde 1939 no prédio destinado à residência do Diretor do Instituto, foi transferido por se tratar de trabalho administrativo, tornando o prédio à sua função original.

— Racionamento de gasolina, álcool e óleo combustível e reativação para produção do gasogênio (mais barato) para transportes e funcionamento de caldeiras e outras máquinas.

— Apesar do racionamento que afetou os transportes, continuou grande o afluxo de turistas ao Butantan, tendo sido registrado o afluxo de 46.114 visitantes.

— De 12.600 fornecedores de cobras, 8.845 estiveram inativos no triênio passado, daí a reativação e a sistematização dos serviços de propaganda. O instituto vinha sofrendo concorrência de instituições particulares com finalidades comerciais.

— A produção de vacina BCG, feita até então no Butantan, passava a ser feita no Instituto Dispensário Clemente Ferreira, praticamente o único consumidor deste produto.

— Em decorrência da Guerra e a participação do Brasil, agravam-se as dificuldades de trabalho do Butantan para solucionar seus problemas técnicos (nas áreas de pesquisa e produção) mas, ainda assim, houve intensificação das atividades industriais para fornecimento de produtos indispensáveis à Saúde Pública e às Forças Armadas, batendo recorde de produção.

— Apesar das atividades de pesquisas estarem prejudicadas, foi publicado o volume XVII das Memórias, com dezoito trabalhos nas seguintes especialidades: Ofiologia, Parasitologia, Escolopendromorfos, Endocrinologia e Bacteriologia.

— Várias pesquisas estiveram em andamento; dentre os assuntos: estudos sobre imunologia, biologia de animais peçonhentos etc. destacando-se especialmente as relativas à produção de soro curativo contra Febre Maculosa e aqueles sobre o preparo da Penicilina; solicitou-se para tanto a ampliação dos respectivos laboratórios.

— Continuou em atividades o Ambulatório Clínico de Endocrinologia no Posto de Saúde Santa Cecília, para estudo de distúrbios hormonais e no projeto de reforma proposto pela diretoria, solicitou-se a criação, neste serviço, de alguns leitos para internamento.

— Várias conferências realizadas por técnicos do Instituto para outras instituições: Ministério da Agricultura, Sociedade Química do Brasil, Sociedade Brasileira de Biologia, Faculdade de Medicina de Recife, Escola de Saúde do Exército, além de reuniões internas.

— Colaboração com outras instituições: Serviço Nacional de Peste, Diretoria do Interior e Cia. Paulista de Estradas de Ferro, quanto a problemas de febre amarela, realizando pesquisas e instalando laboratórios de campo nos locais de foco da doença, além de fornecimento de forragens para várias instituições estaduais, durante a grande estiagem.

— O Butantan participou da colaboração interamericana, colaborando com Costa Rica, Chile e Guatemala no fornecimento de soros antiofídicos e antitetânicos.

— No esforço de guerra, o Butantan colaborou com a intensificação da fabricação de produtos biológicos, dispondo para as Forças Armadas soros, vacinas e especialidades biológicas no valor de um milhão de cruzeiros (antigos) sendo distribuídas em cotas, de 70% para o Exército, 20% para a Marinha e 10% para a Aeronáutica militar.

— Foi concedido crédito especial de um milhão de cruzeiros para aquisição nos Estados Unidos da aparelhagem necessária ao preparo do plasma seco para transfusões.

— Além do que, esta aparelhagem atenderá outras atividades, como secagem da vacina variólica, para sua maior conservação; a manutenção de amostras de vírus e de bactérias; a secagem de venenos, com a conservação quase integral do poder tóxico; o preparo de produtos opoterápicos; a secagem de anticorpos dos soros curativos e da penicilina em via ser produzida no Instituto.

Foi adquirido também, um grande forno elétrico, para esterilização a seco da vidraria dos laboratórios, além de outros aparelhos e produtos.

— As obras do prédio iniciado em 1938 e que estavam paralisadas por falta de verba, foram reiniciadas, prevendo-se sua inauguração para o ano seguinte.

— Remodelação completa da rede elétrica.

— Construção de gasômetro para armazenagem.

— Reforma da rede telefônica para instalação de PBX.

— Projetos para construção de novos laboratórios para a seção de vírus, principalmente para atender necessidade das pesquisas e produção de vacinas e soros contra Febre Maculosa e outras rickettsioses.

— Pelo Decreto 12.401 de 16-12-41 foi desmembrada a área para a Universidade de São Paulo, limitada pelos encanamentos adutores de água que, do reservatório de Cotia se dirigiam para a cidade, cortando as terras do Instituto no sentido horizontal. A Reitoria da Universidade foi autorizada a tomar posse das terras pelo ato de 07-07-1943.

— Foi autorizado pelo Interventor Federal a aquisição de uma fazenda com área suficiente para expansão das atividades do Instituto, com terra adequada para o desenvolvimento da pecuária e exploração agrícola e próximo a linha da Estrada de Ferro Sorocabana. A escolha recaiu sobre a fazenda Riachuelo, no município de Conchas, com 1300 alqueires de terras, sendo analisadas as vantagens para sua aquisição.

— Estiveram em comissionamento o assistente-chefe Plínio Martins Rodrigues no Rio de Janeiro, para freqüentar os serviços de vírus filtrá-

veis da Fundação Rockefeller e do Instituto Oswaldo Cruz; Paulo Marrey, junto à Diretoria de Fiscalização de Alimentação Pública; Antonio de Salles Teixeira, junto à Diretoria de Produção Mineral do Governo Federal; e reassumiu o cargo na seção de Físico-química Gosurin Rarmann, após viagem de estudo nos Estados Unidos.

— Foram intensificadas as criações de animais de laboratórios nos biotérios, aumento de criação de eqüinos, e aprimoramento das raças eqüinas e bovinas. Foram aplainadas e aterradas toda bacia correspondente ao açude existente no Instituto.

— O novo secretário da Educação e Saúde confirmou Flávio da Fonseca no cargo de Diretor.

— Foi concedido ao Butantan pelo Interventor Federal um crédito especial de sete milhões de cruzeiros (antigos); dos quais 5 1/2 milhões para ampliação dos serviços de pesquisas e combate a Febre Maculosa.

— Em 1943, existiam cerca de 280 funcionários trabalhando no Instituto.

— O fluxo de visitantes tinha se mantido alto, apesar das restrições de combustível com a guerra.

— Em estudos, a proposta de reforma do Instituto: necessidade entre outras, de separar as funções de produção industrial e pesquisa nos laboratórios. A produção atingiu a cifra de 3 milhões de cruzeiros.

— "Trabalhos de investigação científica":

1. Pesquisa sobre febre maculosa (Drs. J. Travassos e A. Vallejo Freire) distribuição geográfica dos focos da doença, além da pesquisa e do preparo da vacina preventiva e curativa.

2. Pesquisa sobre a produção dos soros antitetânico e gangrenoso. (Drs. S. C. Calazans e Furlaneto)

3. Pesquisa sobre soros antipeçonhentos e anavenenos (J. B. Arantes) pesquisas sobre o paralelismo que se verifica entre a dosagem do soro anticrotálico por meio do seu poder protetor *in vivo* (pombo) e pela precipitação *in vitro.*

4. Pesquisas sobre difteria (Jandiyra Planet do Amaral) pesquisas sobre imunologia aplicada a difteria.

5. Pesquisa sobre a incidência da peste murina em São Paulo (José Bulcão Ribas).

6 Pesquisas sobre a vacina antitífica (Plínio Rodrigues, Lindorf Carrijo e Celso Brandão).

7. Pesquisas sobre Penicilina (A. R. Taborda, Laura Taborda e Favorino Prado) ensaio de produção semi-industrial de penicilina.

8. Pesquisas parasitológicas (Flávio da Fonseca), pesquisas sobre ácaros e o trabalho de divulgação sobre "Animais Peçonhentos".

9. Pesquisas sobre Zoologia Médica e Ofiologia (Alcides Prado) livro sobre Serpentes do Brasil.

10. Pesquisas sobre animais venenosos (Wolfgang Bücherl) destacando-se o estudo sobre o valor terapêutico do veneno de abelhas nas

algias reumatismais, precisando melhor as indicações do "Reumapiol" fabricado no Instituto Butantan.

11. Pesquisas sobre as quinas brasileiras (F. R. Paes de Barros).

12. Pesquisas endocrinológicas (J. R. do Vale, Ananias Porto, J. I. Lobo, L. Decorert e A. Marcondes da Silva) prosseguimento de pesquisas experimentais e atendimento clínico, onde eram tratados os casos de moléstias endócrinas, muitas vezes com preparado obtido na própria seção: hormônios femininos, tiróidiano e do lobo posterior da hipófise. Estudo sobre a morfologia e Fisiologia do Sistema endócrino dos ofídios e na parte experimental, a verificação da ineficácia das preparações de hormônio de crescimento.

— De junho de 1943 a abril de 1944, assumiu a direção do Butantan o Dr. Otto Bier.

1. Medidas de mudanças para 2.º semestre de 1944; após reunião dos bacteriologistas e imunologistas do Instituto (Calazans, Arantes, Carrijo, Jandyra Planet do Amaral) foi resolvido centralizar o serviço de produção do Instituto, sob a responsabilidade de um assistente-chefe bacteriologista ou imunologista; no caso foi escolhido S. C. Calazans; desta forma procurava-se maior rendimento da pesquisa.

2. Mudanças dos laboratórios de Bacteriologia do Instituto para prédio novo, que abrigaria também a seção de Anatomia Patológica.

3. Reforma e ampliação da Seção de Vírus, riquétsias, e viagem do Dr. J. Travassos da Rosa aos USA.

4. Reformas da biblioteca, do parque do museu.

5. Necessidade de aumento do quadro de cientistas do Instituto, principalmente para a Seção de Química e Ofiologia.

— Início de estudos visando o preparo de vacina contra Coqueluche.

— O soro antitetânico fabricado no Butantan possuía titulagem superior aos internacionais.

— Pesquisas sobre a quinina no tratamento do paludismo.

— Falta de pessoal e recursos materiais dificultando a eficiência de inúmeras pesquisas, dentre elas sobre a Penicilina, ainda assim foram realizados estudos experimentais e ensaios de produção industrial.

1944

— Neste ano foram reorganizados os trabalhos do Instituto e remodeladas as instalações, com importação de vários instrumentos.

— Dr. Otto Bier permaneceu como diretor do Instituto.

— Foram reafirmadas as funções do Instituto, a saber:

a) pesquisa científica;

b) produção de soros, vacinas e outras especialidades biológicas, destinadas ao tratamento das doenças humanas;

c) ensino: cursos de extensão universitária, conferências de divulgação, formação de técnicos especializados etc.

— Foi porém ressaltado "que a pesquisa científica é a atribuição precípua de Butantan, que deve ser considerado essencialmente como um centro de estudos de medicina experimental, em suas particulares aplicações a higiene e a fisiopatologia humana": Otto Bier. Relatório Anual da Diretoria do Instituto Butantan, 1944.

— Principais trabalhos e pesquisas realizados no Instituto: preparo de soros purificados de alto valor terapêutico pesquisados por bacteriologistas e imunologistas na seção de Imunoterapia; processos de dosagem dos soros antiofídicos; inoculação do veneno da cascavel pelo respectivo antiveneno; estudos de imunologia quantitativa com os venenos e seus respectivos antivenenos; diagnóstico bacteriológico da peste, tendo sido identificada a ocorrência da leptospirose em ratos; na seção de Química, a produção de penicilina purificada, sob a forma de sal de bário, obtendo-se resultados iguais à penicilina produzida no estrangeiro. Entretanto optou-se por interromper a produção pois implicaria na criação de infraestrutura industrial, com administração própria, que fugiria às atribuições do Instituto. Prosseguiria apenas estudos relativos a penicilinoterapia e ao controle da penicilina introduzida no país pela indústria farmacêutica norte-americana. Também estavam sendo realizadas pesquisas para se estabelecer as condições de preparo em larga escala da ovo-vacina contra a febre maculosa na seção de Vírus, tendo o assistente-chefe Dr. Travassos da Rosa viajado para USA a fim de adquirir domínios sobre pormenores da técnica com o descobridor daquela vacina Dr. H. R. Cox e comprar as aparelhagens necessárias para produção; pesquisas farmacológicas: ação farmacodinâmica dos venenos crotálicos e botrópicos.

— Ampliação e remodelação das instalações do Instituto:

1.º) reforma do edifício principal, onde funcionava os laboratórios e que passariam a abrigar os serviços de administração, a biblioteca e a sala de reuniões científicas;

2.º) adaptação do embasamento da nova construção destinada aos laboratórios de Bacteriologia e Imunologia e onde se instalaria também o "Serviço de Produção de Plasma Seco";

3.º) reforma geral do Biotério e construção de um biotério para animais inoculados;

4.º) construção de um aviário para o fornecimento de cerca de 2.000 ovos embrionados por semana para seção de Vírus;

5.º) remodelação geral do Parque do Instituto e dos serpentários;

6.º) construção de uma nova cocheira para 200 cavalos;

7.º) adaptação da atual cocheira para funcionamento de museu educativo sobre questões de ofidismo, de biologia em geral de profilaxia e epidemiologia das moléstias infecciosas;

8.º) instalação de um hospital e ambulatório com os serviços anexos de raios X e laboratórios clínicos para internamento dos indivíduos picados por serpentes venenosas e de casos clínicos a serem estudados pela Seção de Endocrinologia, com 10 leitos;

9.º) reforma das instalações da Seção de Vírus;

10.º) construção de um novo pavilhão para os laboratórios de Química, Endocrinologia e Farmacologia com os respectivos biotérios.

— O Estado tem cogitado adquirir uma fazenda para o Instituto com a finalidade de abrigar os cavalos fornecedores de soro em fase de descanso, criação de vitelos para produção de vacina antivariólica e criação de macacos "rhesus".

— O Instituto vinha incrementando e aperfeiçoando a produção da anatoxina tetânica associadamente à vacina tífica, além dos soros antitetânico, antigangrenoso e antianaeróbico.

— No laboratório de difteria, além das pesquisas já iniciadas e da produção de rotina, vinham sendo feitas investigações extensas sobre a freqüência dos portadores de difteria nos grupos escolares da capital e pesquisa sobre a terapêutica combinada soro-penicilina da infecção meningocócica

— Aperfeiçoamento da técnica e obtenção de vacina mais eficiente contra o tifo.

— A endocrinologia prosseguiu em suas pesquisas experimentais e clínicas e na preparação dos hormônios feminino, tiroidiano e do lov posterior da hipófise e pesquisas relativas a veneno de cobras.

— A coleção de ofídios tem aumentado, contando nesta época com 10.501 exemplares.

— Instalação dos laboratórios de pesquisa (Bacteriologia, Imunologia, Controle e Anatomia Patológica) no novo edifício bem como do gabinete do Diretor.

— Com a reforma e ampliação da Seção de Vírus (Pavilhão Lemos Monteiro) visava-se não só o incremento da produção da vacina preventiva contra febre maculosa como estudo de outras moléstias provocadas por vírus (gripe, poliomielite, encefalomielite etc.).

— A estrutura determinada pela reforma de 1931 não correspondendo às atuais necessidades do serviço e no funcionamento prático de vários laboratórios que recebem denominações diversas e desvincularam--se das seções antes estabelecidas foi necessário reorganizar o Instituto de forma a se adequar às atuais exigências.

— A seção de Fisiopatologia foi desdobrada em duas seções autônomas: Endocrinologia e Histopatologia.

— A seção de Citologia e Genética Experimental estava extinta na prática desde 1937, com a saída da Dra. G. von Ubish.

— Foi reiterada a necessidade de maior autonomia do Instituto e não anexação ao Departamento de Saúde, pois ainda que fornecendo produtos a esse departamento, seria necessário maior autonomia à direção do I.B. para aplicação livre na pesquisa do Instituto das rendas provenientes das vendas efetuadas.

— Em 4 de janeiro de 1945 foi aprovado pelo Departamento de Serviço Público a nova estrutura do Instituto Butantan que então passou a ser:

I — Seções Técnicas — Laboratórios de produção e laboratórios de pesquisas:

a) Anatomia Patológica
b) Bacteriologia

c) Endocrinologia
d) Farmacologia
e) Imunologia
f) Imunoterapia
g) Ofiologia e Zoologia Médica
h) Parasitologia
i) Química
j) Riquétsias
l) Vacina Jenneriana
m) Vírus

II — Serviços Técnicos Auxiliares:

a) Biblioteca
b) Desenho e Fotografia
c) Hospital Vital Brazil
d) Horto Oswaldo Cruz
e) Museu e Serpentário
f) Meios de Cultura e Esterilização
g) Criação de Animais e Culturas
h) Cocheiras de Imunização

III — Serviço de Administração:

a) Seção de Comunicação
b) Seção de Expediente
c) Seção de Contabilidade
d) Seção de Material e Transporte
e) Oficinas e Obras.

As duas antigas seções de Físico-Química Experimental e de Botânica Médica foram extintas e criadas então as seções de Controle, Farmacologia, Imunoterapia, Riquétsias e Vacina Jenneriana.

Os serviços de produção se centralizaram numa seção única, a Imunoterapia, sob a chefia de S. C. Calazans de forma de melhorar tanto a produção como aumentá-la, estimular a pesquisa científica, antes sobrecarregada com encargos de produção.

— A seção de Imunoterapia distribuiu os seus serviços por 3 laboratórios:

1. Produção de bacterinas e soros antibacterianos.

2. Produção de toxinas, anatoxinas e soros antitóxicos.

3. Serviço de sangrias, concentração de soros e distribuição de produtos.

— A produção de anavenenos e de antivenenos ainda não foi anexada ao centro de produção, estando sob a responsabilidade do Dr. J. B. Arantes. E a produção de vacina jenneriana se manteve na seção respectiva, sob a chefia de Cícero Neiva, sendo neste ano aumentada a produção, devido ao surto de varíola na Capital.

— Além das reformas dos prédios, foi instalada a rede PBX e adquiridas várias aparelhagens de laboratórios, de escritório e maquinário agrícola.

— Foi necessário aumentar o volume de vendas dos produtos feitos através do representante comercial, quer no Brasil como no estrangeiro. Daí a necessidade de dispor a Diretoria de maiores verbas para aquisição de material destinado à produção. Uma vez que a legislação federal proibia a aplicação direta de renda que deveria obrigatoriamente ser recolhida ao Tesouro, pleitearia esta Diretoria, por eqüidade, em relação ao que acabava de ser concedido ao Instituto Biológico de São Paulo e a outras repartições do Estado, que se consignasse no orçamento uma verba mínima de Cr$ 200.000,00 para ser empregada no desenvolvimento do serviço de produção de soros e vacinas no Instituto Butantan (a tal verba seria compensada por anulação da receita com parte da renda, recolhida ao Tesouro no mesmo exercício).

— Estavam sendo examinadas as condições para aquisição da Fazenda São Joaquim, de propriedade de Emílio Guerra, no município de São Roque, situada próxima à estação de São João, da Estrada de Ferro Sorocabana. A Fazenda possuía 470 alqueires de terras, com excelentes instalações e infra-estrutura básica, tendo já bem desenvolvida a criação de animais.

— Necessidade de melhorar o nível do pessoal técnico do Butantan e da instituição de melhores salários de acordo com o regime de tempo integral. Necessidade de contratação de mais pessoal técnico especializado de nível superior.

— O Decreto-lei número 15.094 de 11-10-45 reorganizou o Instituto Butantan.

— A nova reorganização dos serviços técnicos do Instituto permitiria maior autonomia da direção para articular e agrupar os laboratórios, de acordo com a estrutura interna de funcionamento prático do mesmo, conveniência e necessidade do serviço.

— Assim ficariam distribuídos os serviços técnicos:

A) Laboratórios de Produção:

1. Serviço de Imunoterapia:

a) Laboratório de Bacterinas e Soros antibacterianos: Drs. S. C. Calazans e Favorino Prado Jr.

b) Laboratório de Antígenos tóxicos e soros antitóxicos: Dr. R. S. Furlanetto.

c) Laboratório de Concentração e Purificação de Soros: Dr. Celso Brandão.

2. Serviço de controle (incluindo a produção de anavenenos e antivenenos) Dr. J. B. Arantes.

3. Serviço de Vacina Jenneriana: Dr. Cicero Neiva.

4. Dependências anexas: Meios de Cultura, Esterilização e Lavagem; Sangrias e Distribuição asséptica de produtos.

B) Laboratórios de Pesquisas:

1. Laboratório de Anatomia Patológica:

a) Histopatologia: Professor Dr. Moacir Amorim; Dr. C. A. Salvatore (estagiário);

b) Hematologia: Dr. Gastão Rosenfeld;

c) Citogenética: Professor G. Schreiber (estagiário).

2. Laboratório de Bacteriologia: Dra. Jandiyra Planet do Amaral, Dr. E. Biocca (estagiário).

3. Laboratório de Botânica Médica: Dr. Fernando Paes de Barros.

4. Laboratório de Endocrinologia: Drs. J. R. do Valle, J. Leal Prado, S. B. Henriques e O. B. Henriques (estagiário).

5. Laboratório de Farmacologia: Dr. Ananias Pereira Porto.

6. Laboratório de Imunologia: Dr. A. Vallejo Freire, Dr. F. Eichbaum (estagiário).

7. Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica:

a) Ofiologia: Dr. Alcides Prado;

b) Zoologia Médica: Dr. W. Bücherl.

8. Laboratório de Parasitologia: Drs. Flávio da Fonseca e A. T. Leão.

9. Laboratório de Química: Dr. F. Berti, Dr. H. W. Rzeppa (estagiário).

10. Laboratório de Vírus: Drs. J. Travassos, Plínio M. Rodrigues, L. M. Carrijo e Luiz A. R. do Valle (estagiário).

— Aumento de 3,5 vezes a produção de toxina diftérica com relação ao ano anterior (1.838.900 cm^3).

— Viagem do Dr. R. S. Furlanetto ao Chile para aperfeiçoamento técnico do preparo do soro antigangrenoso e outros estudos referentes a anaeróbios no Instituto Bacteriológico do Chile.

— 26 Pesquisas científicas realizadas: nas áreas de Imunologia, Bacteriologia, Parasitologia, Soroterapia, Patologia, Ofiologia, Endocrinologia, etc.

— Dos serviços novos, apenas o Serviço de Plasma foi iniciado, pela impossibilidade material de sua instalação no prédio, que ainda se acha em construção.

— Foi inaugurado o Hospital Vital Brasil em 12-11-1945 com a presença do Secretário da Educação Jorge Americano e de Vital Brasil, então homenageado. O hospital funcionou na antiga residência do Diretor (atual diretoria).

— O Decreto n.º 14.678 de 24-4-45 autorizou o governo do Estado a adquirir a Fazenda São Joaquim, e o Estado já entrou na posse da mesma, dando início aos trabalhos, inclusive o plantio de 50 alqueires de milho.

— Dentre as construções novas já concluídas estavam: pavilhão para 1.000 coelhos, biotério de animais inoculados, instalação do Laboratório de Endocrinologia, Laboratório de Vírus, Laboratório de Parasitologia e instalação definitiva dos Serviços de Esterilização e Lavagem, e da Câmara de Distribuição Asséptica.

— Foi sugerido pelo diretor ao Governo do Estado autorização para que através da firma Produtos Butantan Ltda., o Diretor do Instituto pudesse contratar pessoal para serviço da produção, correndo tais despesas por um encontro de contas com o produto das vendas feitas ao representante comercial. Desta forma se estabeleceria um regime de semi-autarquia a ser adotado apenas no setor de Produção.

— Dentre os objetivos propostos para o ano seguinte estavam: aumento do quadro de pessoal técnico especializado, contratação de biologistas e químicos, viagens de técnicos do Butantan a centros de pesquisas estrangeiras.

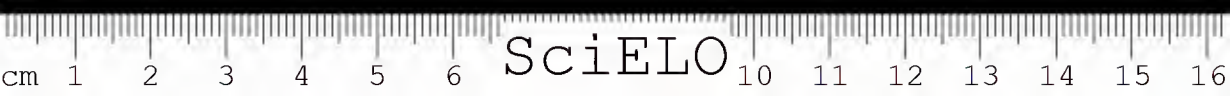
— Desenvolver Serviço de Pesquisas sobre Malária, conforme plano apresentado por Flávio da Fonseca.

E também deveriam ser desenvolvidos os trabalhos para preparo da vacina contra gripe, um serviço de pesquisa sobre vírus neurotrópicos (encefalites, poliomielite) incluindo o diagnóstico, a epidemiologia e a profilaxia (eventualmente o preparo de vacina preventiva). Anexo ao serviço de plasma, a instalação de um laboratório para determinação de eletroforese, seguindo o método de Fiselius.

— Necessidade de reorganizar os serviços de contabilidade e aumentar pessoal administrativo.

— Necessidade de contabilizar o fornecimento de produtos a Departamento de Saúde como Receita da repartição.

— Foi extinto o armazém para fornecimento de gêneros de primeira necessidade anexo à Caixa Beneficente.

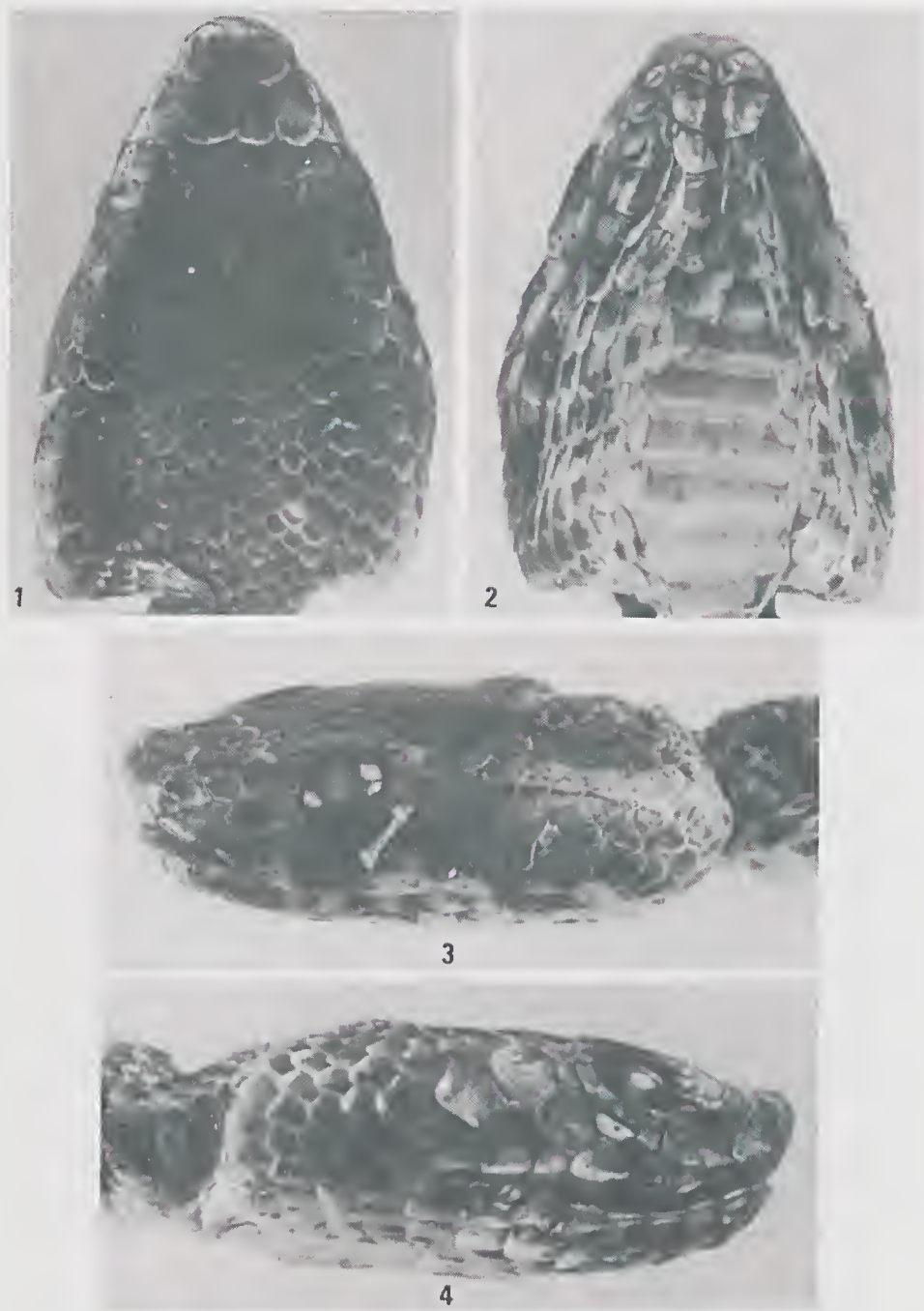
Mem. Inst. Butantan
44/45:81-118, 1980/81

NOTES ON MICRO AND ULTRASTRUCTURE OF "OBERHÄUTSCHEN" IN *VIPEROIDEA* *

A. R. HOGE**
S. Alma ROMANO HOGE***

ABSTRACT: Description of a new technique for microscopical study of "Oberhäutschen; description of a new genus: *Protobothrops*; the genera, *Porthidium*, *Bothriechis* and *Bothriopsis* are considered as distinct from *Bothrops*; with a short diagnose of the *Agkistrodontini*, and redescription of *Calloselasma rhodostoma* and *C. annamensis*.
KEYWORDS: "Oberhäutschen; Viperoidea; *Protobothrops; Porthidium*; *Bothriechis*; *Bothriopsis*; *Agkistrodontini*; *Calloselasma rhodostoma*; *Calloselasma annamensis*.

INTRODUCTION

This preliminary account on *Crotalid* snakes is based on the study of a large number of specimens. Besides the classical methods in sistematic zoology, special attention is given to the superficial structure of the skin. In 1953 the Senior author and Souza Santos published a paper on submicroscopic structure of "Stratum corneum" (oberhäutschen) showing the value of the method in taxonomy. Besides the electron microscopic method a new method for use in optic microscopy is described. The conclusion is that the method is extremely useful. For the moment about 90% of the species from the *Bothrops Trimeresurus* complex were examined. Definitions of the genera will be modified but to avoid useless changes in nomenclature the authors will wait to complete their studies before introducing the changes maintaining for the moment a more conservative nomenclature. The solenoglyphous snakes are included in a superfamily, *Viperoidea* subdivided into two families: *Atractaspiidae* for the primitive colubrid-like Mole false vipers; *Viperidae* for the vipers, with four subfamilies: *Viperinae* (true vipers); *Azemiopsinae* (Mole Vipers); *Causinae* (Night adders) and *Crotalinae* (Pit Vipers). The *Crotalinae* are

* This work was supported in part by grant LM 00418 — LM 00698 from the National Library of Medicine, National Institutes of Health, US Department of Health Education and WelWelfare; by the CNPq and FINEP, BRAZIL.
** Director of the Division of Biology, Institute Butantan — 05504 — Cx. postal, 65 — São Paulo — BRAZIL.
*** Scientif Researcher from the CNPq, Institute Butantan — BRAZIL.

Figs.: 1, 2, 3, 4 — *Calloselasma annamensis* holotypo ♀

Mus. Nat. Hist. Nat. n.º 3.323

Fig. 5 — *Calloselasma annamensis* holotypo ♀

Mus. Nat. Hist. Nat. n.º 3.323

divided in two tribes; *Agkistrodontini* for the genera *Agkistrodon, Calloselasma, Deinagkistrodon, Gloydius* and *Hypnale* (Hoge and Romano Hoge, 1981), and *Crotalini* for the genera; *Crotalus* and *Sistrurus* (Rattlesnakes); *Bothrops, Porthidium, Bothriechis* and *Bothriopsis* (American scale snouts); *Trimeresurus*, and *Protobothrops* (Asiatic Pit Vipers); *Tropidolaemus* (Chin--keeled Pit Viper) and *Ovophis* (The mountain and Okinawan pit viper). The genus *Agkistrodon* "sensu auctores" is considered as formed by five genera: *Agkistrodon* for the American species; *Calloselasma* for *C. rhodostoma* and *C. annamensis; Deinagkistrodon* for *D. acutus; Gloydius* for the asiatic forms except *Deinagkistrodon, Calloselasma* and *Hypnale* for *H. hypnale, H. nepa* and *H. walli.*

METHODS

Besides the classical methods in systematic zoology, special attention is paid to microscopic and ultramicroscopic structurs of "Oberhäutschen" Pockrand 1937. (Epitrialschicht of Leydig 1873, "stratum corneum" of Hoge et Souza Santos, 1953). Direct optical examination of "oberhäutschen" is very difficult due to the thickness of the preparation. A new technique of replica is used for examination with optical microscope. Instead of making replicas by the "striping method (Schaffer 1943) the replica was done directely on the slide. The slides are from Plexiglas, a drop of chloroformium is placed on the plexiglas and the snake scales are pressed against leaving a perfect replica of the scale. This preparations can be stored indefinitely unlike the ones by the dry-striping method. The examination of the replicas was made with the help of a Siemens electron microscope type UM 100 b at original magnifications of 1300 and 6300.

STRUCTURE OF "OBERHÄUTSCHEN"

Comparing the microscopic, and or, the submicroscopic structures of *Bothrops* and *Trimeresurus* (fig. 27, 28, 51 and 52) it is easy to distinguish them on the base of their pattern.

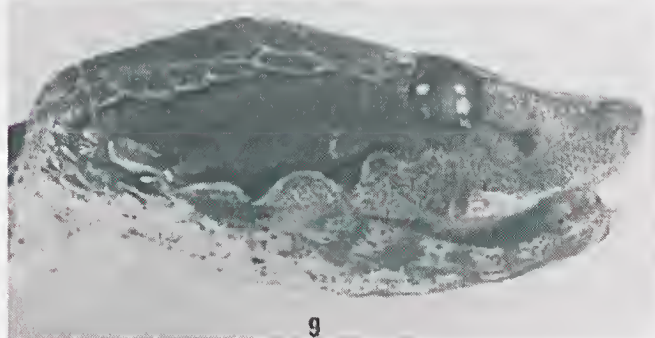
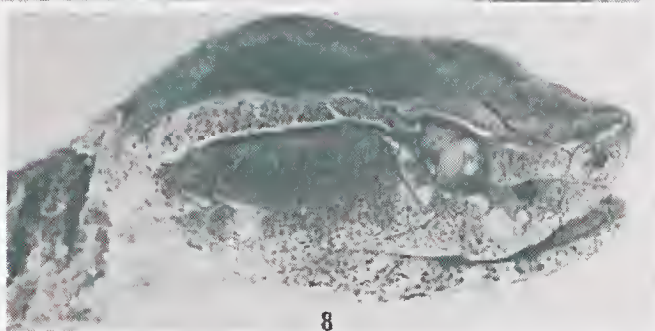
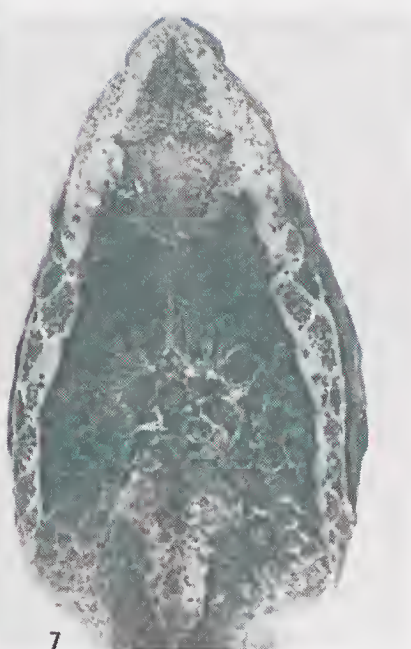
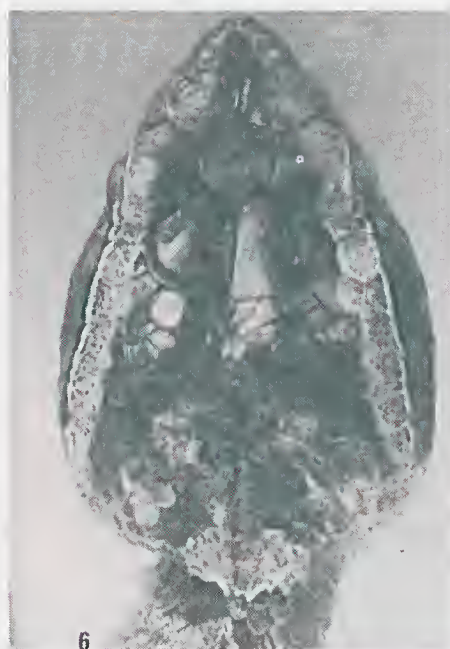
The very large number of species already examined permit us to conclude that very distinct patterns permit the use of this structure for the distinction of genera for ex.: *Boa; Xenoboa; Eunectes; Corallus; Lystrophis; Conophis; Ditaxodon; Python* etc. (figs. 31 to 39 and 44, 45).

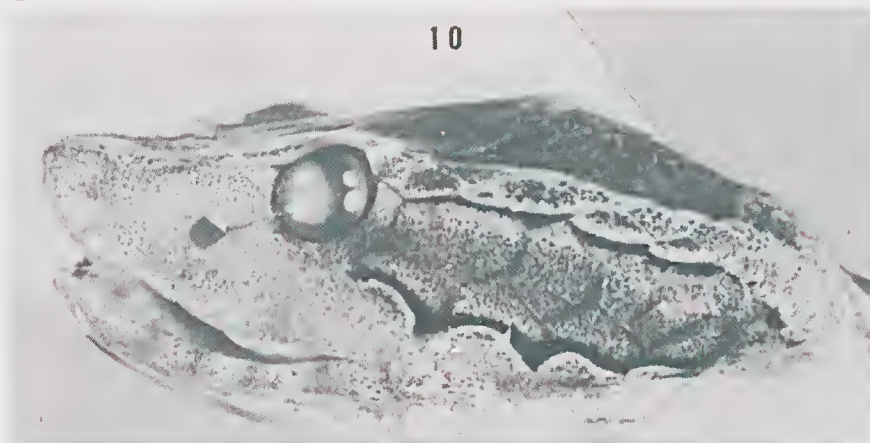
Between *Viperidae* the distinction of: *Atheris, Echis, Vipera, Bothrops, Trimeresurus, Tropidolaemus* etc. is possible on the base of the ultrastructure.

A very large number of genera and species are already examined and the results will be published in a fortcoming paper.

Here we will limit us to a few genera and species of *Crotalinae.*

Using the replicas prepared for optical microscopic examinations the shape of cells and microornamentation is easely observed (fig. 46 and 62).

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:81-118, 1980/1981.

Figs. 6 and 8 — *Calloselasma annamensis*
Mus. Nat. Hist. Nat. n.º 1920 — A 215

Figs. 7 and 9 — *Calloselasma rhodostoma*
Mus. Nat. Hist. Nat. n.º 1970-583

Figs. 10 and 11
Calloselasma rhodostoma
Mus. Number: MNHN n.º 1970 — 583
Locality: Plantation Krek, Cambodge
Collector: Saint Giron

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:81-118, 1980/1981.

Before discussing the results it seem interesting to observe that, sometimes different patterns appears in the same genus (sensu auctores) but till now the different patterns are always associated with other characters.

Although the use of the scanning microscopic give the best results, the optic technique here described, is very usefull, simple and permit a quick observation.

Bothrops: a pattern of allongated and generally keeled cells (fig. 51 and 27 and 29).

Trimeresurus: a pattern of large, not or nearly not allongated cells (fig. 28 and 52).

Tropidolaemus: a pattern of rounded cells, strongly covered with complicated keells and stripes (fig. 53 and 58).

In *Ovophis* the pattern observed (only *O. okinavensis* and *O. chaseni* studied) is quite similar to *Trimeresurus* (fig. 62).

A distinct pattern was observed in *flavoviridis, mucrosquamatus* and *jerdoni*. This pattern together with other characters permit to put them in a distinct genus.

Protobothrops Gen. Nov.

DIAGNOSIS

A pit viper with allongated, not forked, and generally edentulous palatine (fig. 80). The maxillary without the projection on border of cavity, similar to *Bothrops;* the anterior border of ectopterigoid not enlarged as in *Trimeresurus* and *Ovophis*. Splenial and angular distinct; structure of paraventral with fingerlike projections; structure of dorsals showing a striated pattern (fig. 41). The median wing of the prefrontal, unlike in *Trimeresurus* and *Tropidolaemus,* present, but small in size.

RELATIONSHIP

Related to *Bothrops* by the pattern of paraventral structure (fig. 42). Easely distinguished from *Trimeresurus* by the structure of dorsals, paraventrals (fig. 40 and 41); the different shape of palatine, maxillary, ectopterygoid, and prefrontal (figs. 80, 81).

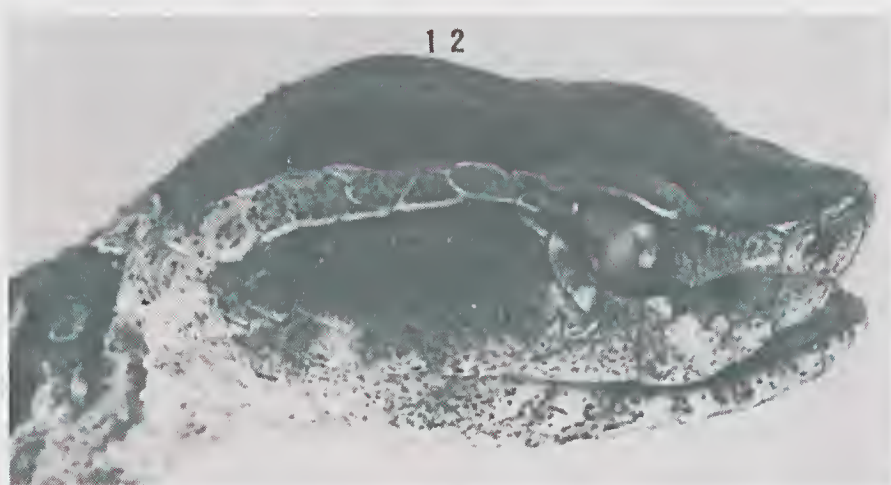
Type species: *Protobothrops flavoviridis.*

Species here considered as belonging to the genus *Protobothrops*: *P. flavoviridis* (Hallowell 1860); *P. jerdoni* (Günther 1875) and *P. mucrosquamatus* (Cantor, 1839).

Bothrops

The genus Bothrops as here defined can be characterized by:

Palatine deeply forked (fig. 68), internal border of maxillary not provided with projection; ectopterygoid with anterior part not large and square; splenial and angular present; structure of dorsals showing allongated and keelled cells (figs.: 75, 27, 29 and 55).

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:81-118, 1980/1981.

Figs. 12 and 13

Calloselasma annamensis Angel

Locality: Cap. Saint Jacques, Sud Vietnam

Mus. Number: MNHN — 1920 A 215

Col.: Mignon.

Fig. 14

Calloselasma annamensis

Locality: Plantation Krek, Cambodge

A few species of *Bothrops* "sensu auctores" do not share all those characters: *undulatus, bicolor, schlegeli, lateralis, nigroviridis, nummifer* and *lansbergii.*

Although more data has to been computed before further subdividing the Bothrops group a few genera can already be revalidated.

Porthidium Cope

This genus related to both *Bothrops* and *Trimeresurus* differs from *Bothrops* by the structure and ultraestructure of dorsals wich are closely related to the ones observed in *Trimeresurus* (fig. 46).

From *Trimeresurus* by shape of maxillary and ectopterygoid wich are similar to the ones observed in *Bothrops* (figs. 66, 72).

The shape of palatine is somewhat intermediate between *Bothrops* and *Trimeresurus.* Differs from *Bothrops* and *Trimeresurus* by having splenial and opercular fused (figs. 70 and 76).

The genus *Porthidium* as here defined is diferent from Burger's conception of the genus Burger states that all but *nasutus* have splenial and angular separated. The specimens of *lansbergii* examined all have splenial and angular fused.

Type species: *Porthidium lansbergii* (Schlegel), 1841.

The following species are included in this genus: *P. brachstoma, P. dunni, P. nasutus, P. ophryomegas,* and *yucatanicus* (not seen).

Bothriechis Peters

This genus already recognized by Savage is really different from the genus *Bothrops* by the structure of "oberhäutschen" (fig. 57).
Type specimes: *Bothriechis nigroviridis* species here included in the genus

B. nigroviridis subsp. (including *rowleyi*?).

Bothriopsis Peters

This genus already recognized by Burger is here restricted to *B. castelnaudi* and *B. lichenosus.*

Diagnosis will be given in a forthcoming paper.
Type species: *B. castelnaudi.*

Species here included *B. castelnaudi* with *B. lichenosus* either as a species or subspecies.

Genera *inquerendae*

undulatus, bicolor, schlegeli, lateralis, pictus, nummifer, supraciliaris, till now in the genus *Bothrops* "sensu auctores". Some species, specially *bicolor,* are closely related to *Trimeresurus.* (Fig. 43).

The species *T. kaulbacki* and *T. kanburiensis* still need to be studied. *T. capitetriangulatus* although having the maxillary and palatine of the *Trimeresurus* shape, a distinct striped pattern of dorsal scales the shape of ectopterygoid also is quite unusual. More specimens are needed before conclusion.

Fig. 15
Calloselasma rhodostoma

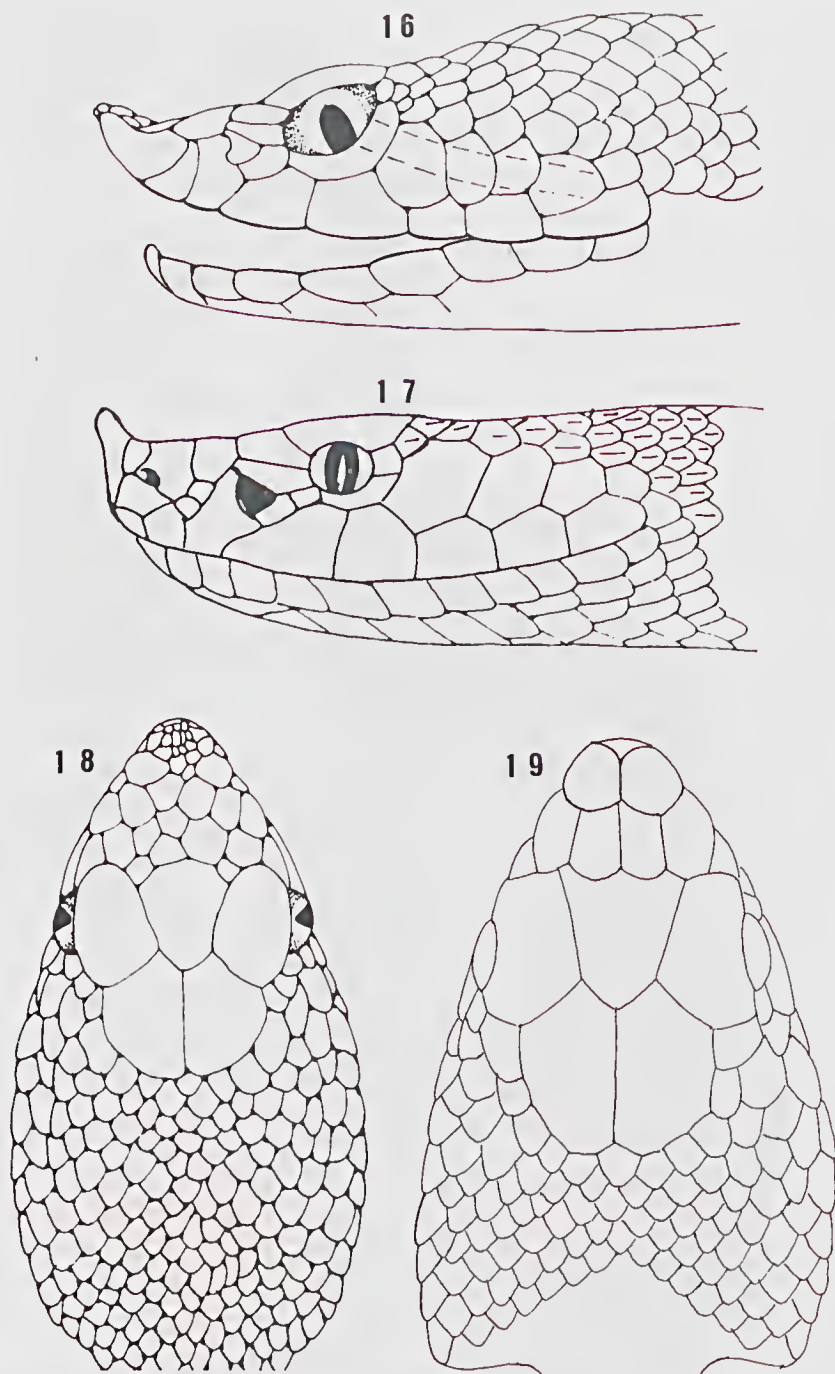



Fig. 16 and 18 — *Hypnale nepa* ♀ — MNHN Paris — N.° 4.042

Fig. 17 — *Deinagkistrodon acutus*

Fig. 19 — *Calloselasma annamensis* type

Agkistrodontini (Historical)

In 1896 Boullenger included in the same genus *Agkistrodon* the genera *Hypnale* Fitzinger, 1843, *Halys* Gray, 1849 (non Fabricius, 1803) and *Calloselasma* Cope (nom. nov. pro *Leiolepis* Duméril, 1853) (non Cuvier, 1829), nearly no attempt was made for the revival of those genera, except by:

1957 Chernov who removed *Calloselasma* from the synonymy and gave additional reasons for the revival of the genus. Unfortunatelly he was not followed by the authors.

1971 Burger in his doctor thesis (l.c.) revived *Calloselasma* and *Hypnale*. Burger used *Agkistrodon* for the American species, *Calloselasma* for the species *rhodostoma* and *acutus* and *Hypnale* for the other Asiatic species.

1977 Gloyd revived *Hypnale* (without mention to Burger's thesis or to Dissertation Abstract International *32* (10)1972 but restricted to *Hypnale* only the species *H. hypnale; H. nepa* and a new species *H. walli*, giving a good diagnosis.

1978 Gloyd describes a new genus *Deinagkistrodon* for the single species *acutus*.

1981 Hoge and Romano Hoge conclude that *Agkistrodon* "sensu auctores" is a complex of five genera: *Agkistrodon* Beauvois, Calloselasma Cope, *Deinagkstrodon* Gloyd, *Hypnale* Fitzinger and a new genus *Gloydins*. They subdivide the subfamily *Crotalinae* in two tribe: *Crotalini* and *Agkistrodontini*.

TRIBE *Agkistrodontini*

Rattleless pit vipers with large symmetrical shields on top of the head; sometimes the internasals and prefrontals broken up into scales of scalelike shields. When broken up in scales dorsals in 17 row at midbody.

Contains five genera: *Agkistrodon* Beauvois, 1799; *Calloselasma* Cope 1859; *Deinagkistrodon* Gloyd 1978; *Gloydius* Hoge and Romano Hoge 1981 and *Hypnale* Fitzinger, 1843.

Range: Asia from the borders of Caspian Sea Eastwards to Japan and southwards to Sri-Lanka and Indonesia; North and Central America.

DIAGNOSIS OF THE GENERA

Agkistrodon Beauvois, 1799

A rattleless Pit Viper; nine large symmetrical shields on the upper surface of the head; internasals and praefrontals well developed; dorsals keeled; anterior subcaudals single; upper labials usually forming the anterior border of the loreal pit; snout not produced in a dermal appendage; skull short and broad; supratemporal (tabular) extending beyond the braincase. Skull very broad, as broad or nearly as broad as the distance of praefrontals from posterior and of braincase; palatine not deeply forked; ectopterygoid not hooked; broad and strongly curved,

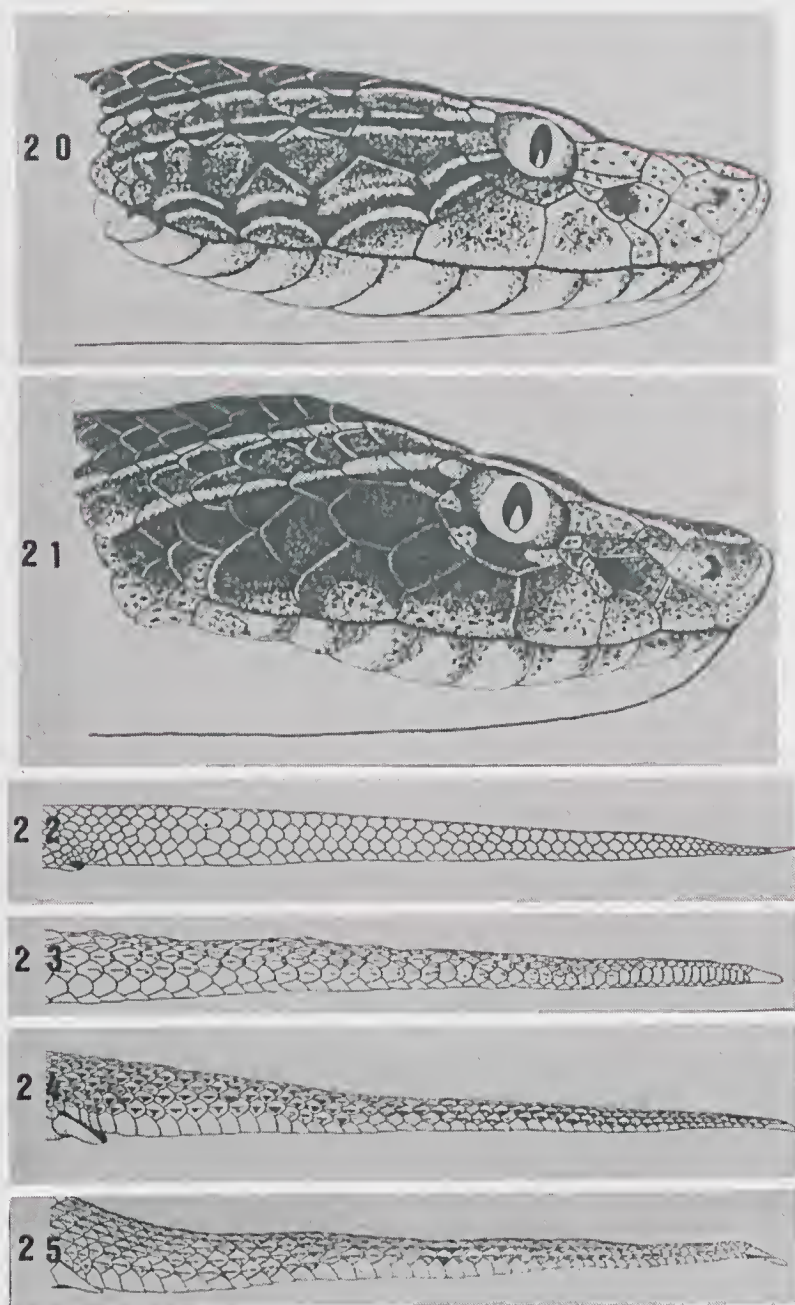



Fig. 20 — *Calloselasma rhodostoma*
Fig. 21 — *Calloselasma annamensis*
Fig. 22 — *Calloselasma rhodostoma*
Fig. 23 — *Deinagkistrodon acutus*
Fig. 24 — *Agkistrodon contortrix*
Fig. 25 — *Gloydius blomhoffii blomhoffi*

Fig. 26 — *Calloselasma rhodostoma*
Courtesy of Knoll-Twyford Lab.
Photo Silberzahn und Meinberg.

articulated with pterygoid on both internal and external side angular and splenial separated (fig. 77) (except for *A. bilineatus* fide Marx, 1972).

The structure of "Oberhäutschen" shows allongated cell contours, (fig. 59).

Not related to any asiatic or european genera of *Agkistrodontini,* charing only a single character with the monotypic genus *Deinagkistrodon,* in not having angular and splenial fused.

Contains: Three species, all viviparous.

Range: From North to Central America.

Calloselasma Cope 1860

A rattleless Pit Viper with; dorsal scales smooth loreal pit separated from the labials; subcaudals paired, palatine very peculiar with a long anterior process toothles or provided with a single teeth, ectopterygoid slender, hooked and not strongly curved; braincase broad, supratemporal not or nearly not extending beyond braincase; angular and splenial fused (fig. 82). Structure of oberhaütschen nearly structurless not related with any of the other genera of *Agkistrodontini.*

Contains: Two species: *C. rhodostoma* and *C. annamensis,* oviparous.

Range: From Laos to Djawa.

Deinagkistrodon Gloyd, 1978

A rattleless Pit Viper related to both *Agkistrodon* and *Calloselasma.* Dorsal scales keeled; snout with a distinct dermal appendage; scales of the lowermost row near the tip of the tail distingtly higher than wide, (upper head shields finely granulated; loreal pit bordered by the second upper labial; palatine with a dorsal process, deeply forked in front and provided by ±5 teeth ectopterygoid slender not hooked, even more strongly articulated with pterygoid than in *Agkistrodon.* Oberhäutschen with rounded cells (fig. 61).

Angular and splenial not fused; (fig. 78)

Contains: a single species. Viviparous.

Range: South China, Tong-King, Taiwan.

Gloydius Hoge and Romano Hoge 1981

A rattleless pit viper different from, *Agkistrodon, Calloselasma* and *Deinagkistrodon* by cranium wich is long and narrow scales of the lowermost row near the tip of the tail not distingtly higher than wide, from *Calloselasma* by the keeled dorsals and not hooked ectopterygoid; from *Deinagkistrodon* by the absence of produced dermal appendage on snouth; from both *Agkistrodon* and *Deinagkistrodon* by very short supratemporals not extending posteriorly beyond the braincase. Angular and splenial fused or not (Fig. 83). The M. O. different from all other *Agkistrodontini* but remembering both *Protobothrops (Crotalini)* and *Agkistrodon* (*Agkistrodontini*).

Contains: Seven species. Viviparous.

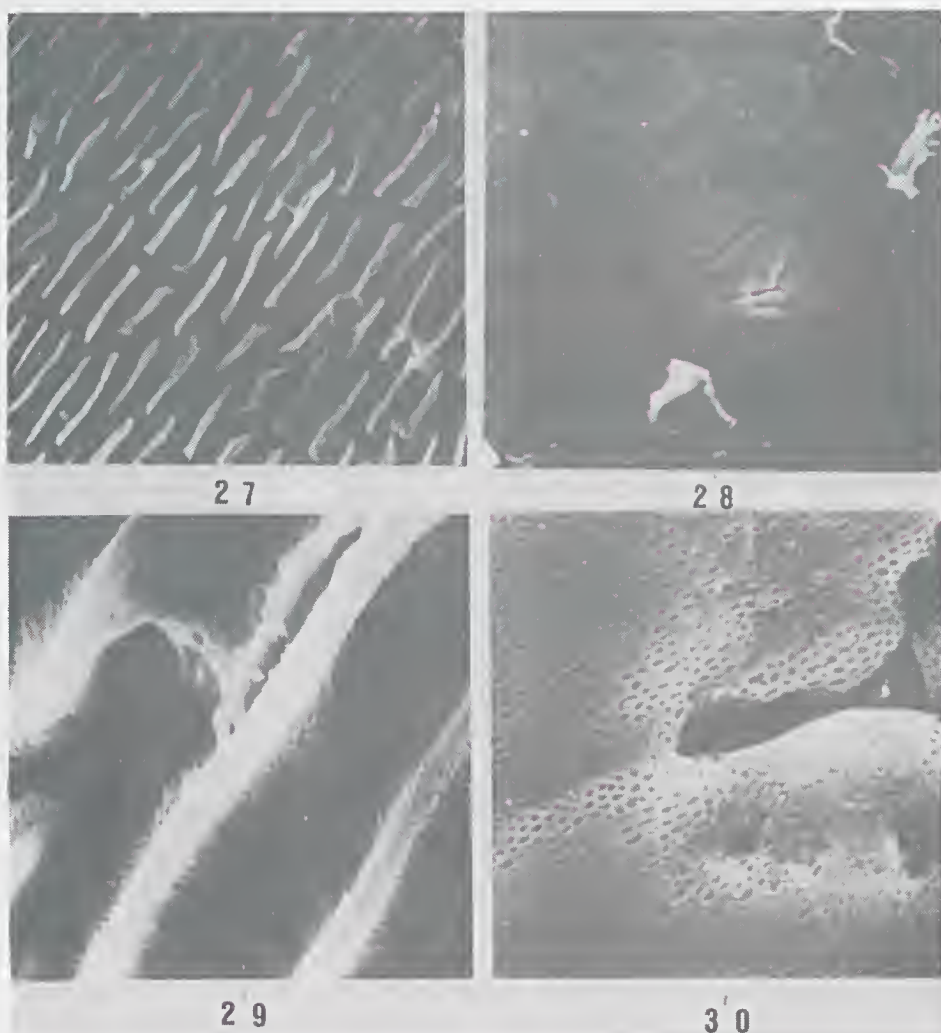



Fig. 27 — *Bothrops pradoi* (Scan. Micr. x 530)

Fig. 28 — *Trimeresurus gramineus* (Scan. Micr. x 530)

Fig. 29 — *Bothrops pradoi* (Scan. Micr. x 4,500)

Fig. 30 — *Trimeresurus gramineus* (Scan. Micr. x 4,500)

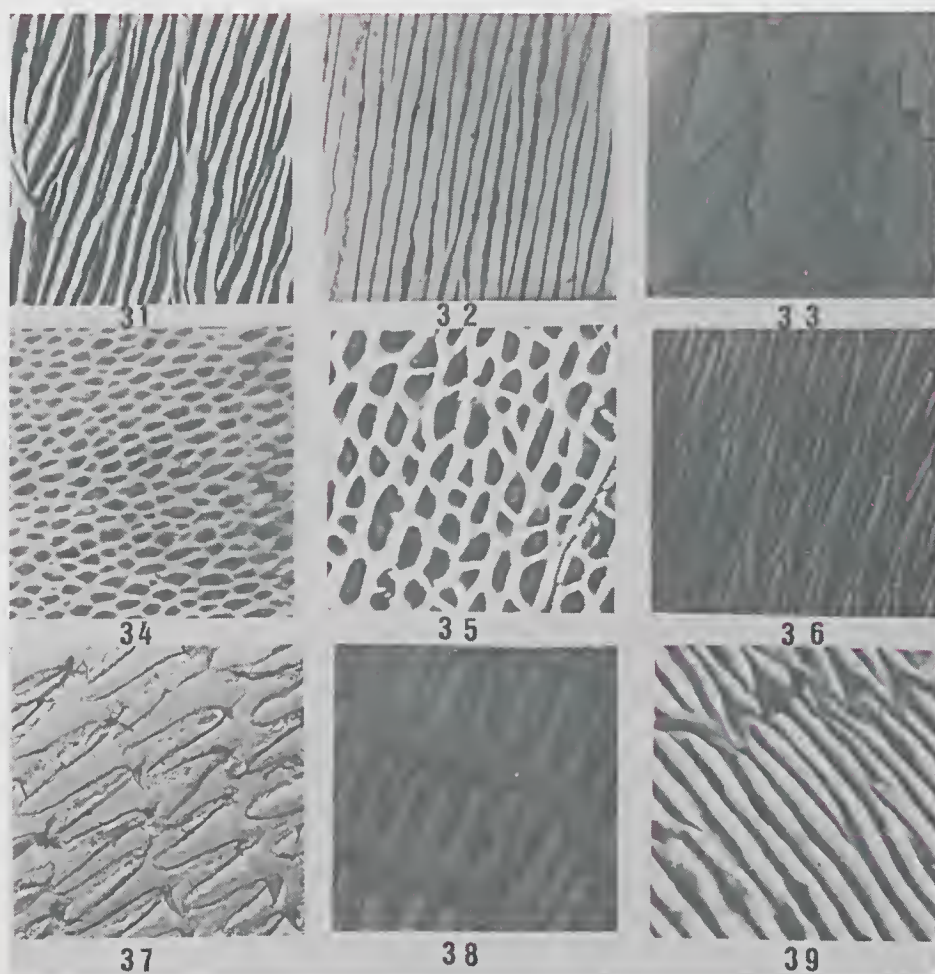



Fig. 31 — *Boa constrictor constrictor amarali* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)
Fig. 32 — *Xenoboa cropanii* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)
Fig. 33 — *Eunectes murinus* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)
Fig. 34 — *Tropidophis paucidens* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)
Fig. 35 — *Corallus caninus* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)
Fig. 36 — *Lystrophis nattereri* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)
Fig. 37 — *Conophis vittatus* — Type specimen — (Dorsal Electron Micr. x 7,200)
Fig. 38 — *Python rcticulatus* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)
Fig. 39 — *Crotalus durissus terrificus* (Dorsal Electron Micr. x 6,200)

Range: Eastern Europe; Continental Asia southwards to Indonesia and westwards to Japan.

Hypnale Fitzinger 1843

Distinct from, *Agkistrodon, Calloselasma, Deinagkistrodon* and *Gloydius* by the praefrontals and internasals which are broken up in scales by the dorsals which are in 17 rows; by the presence of a very short and strongly hooked ectopterygoid (only slightly hooked in *rhodostoma*) ; from *Agkistrodon* and *Gloydius* by the pattern of M.O., angular and splenial fused, (Fig. 84).

Contains: Three species. Viviparous.

Range: Sri-Lanka and India, Western Ghats as far north as 16.º L.N.

ANNAMENIAN AND MALAYAN PIT VIPERS

During a stay at the "Laboratoire of Reptiles et Amphibiens" of the "Museum National d'Histoire Naturelle" in Paris, a very distinct pattern in some specimens of *Calloselasma* called our attention.

The fine collection of Reptiles and superior library of the Paris Museum; the large series of specimens in the British Museum and Rijksmus. Nat. Hist. at Leiden besides the previous notes on specimens in several other institutions, enabled us to conclud that two taxons are included under the name of *Agkistrodon rhodostoma.*

In march 1981 a visit to the Knoll-Twyford laboratories at Ludwigshafen allowed us, not only to observe the largest known series of live Malayan pit vipers, but also complete the data on geographical distribution. The Twyford laboratories maintain several hundreds of *Calloselasma rhodostoma* to produce the venom necessary for the elaboration of a commercial anticoagulant.

A drawing in Seba (1736) seems to be the first reference to a specimen of the actual genus *Calloselasma* but the poor quality of the fig. turns identification doubtfull, almost impossible.

The first good description of a specimen of *C. rhodostoma* belongs to Patrick Russel 1801-1809, pl. XXI:24-25. This description and drawing was based on a specimen from Java. No scientifical or vernacular name was given.

Reinwardt in Boie (1827) was the first to name the species as *Trigonocephalus rhodostoma.*

For about twenty years this species was consecutively included in the genera: *Vipera; Trigonocephalus* and *Tisiphone.*

Duméril (1853) created a separate genus for *rhodostoma, Leiolepis,* unfortunately preocupied by *Leiolepis* Cuvier (Lizard).

Cope (1860) gives a subst. name, *Calloselasma* for *Leiolepis* Duméril 1853.

Boulenger (1896) puts *Calloselasma* in the synonymy of *Ancistrodon* in his Catalogue.

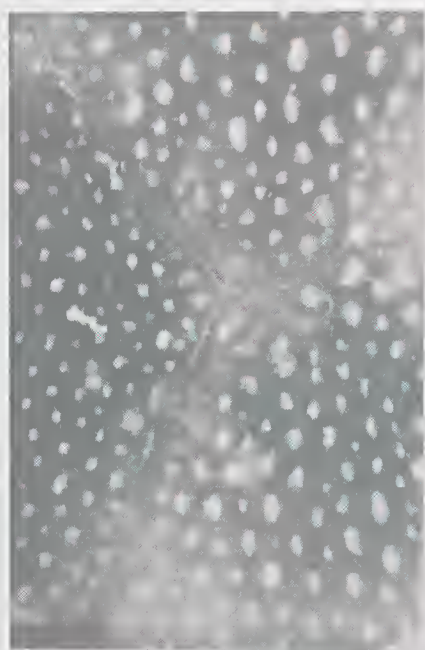
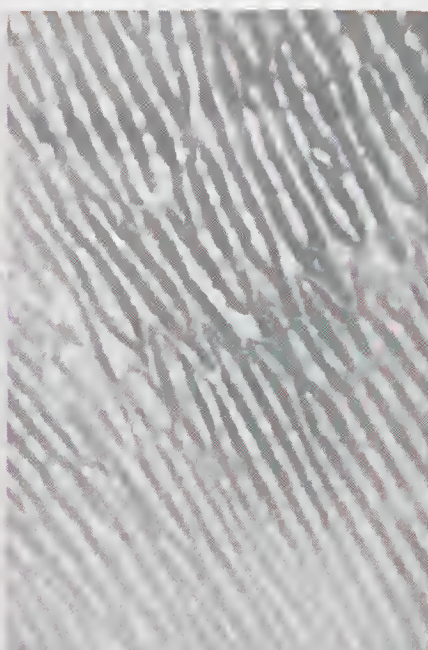
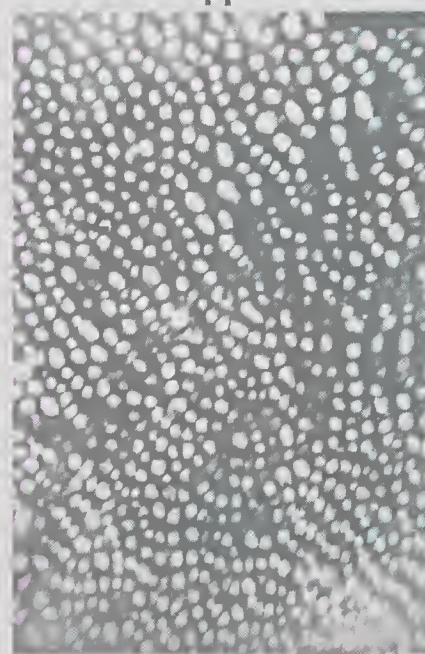



Fig. 40 — *Trimeresurus albolabris* (Dorsal Electron Micr. x 8000)
Fig. 41 — *Trimeresurus jerdoni* (Dorsal Electron Micr. x 8000)
Fig. 42 — *Bothrops jararacussu* (Paraventral Electron Micr. x 8000)
Fig. 43 — *Bothrops bicolor* (Paraventral Electron Micr. x 8000)

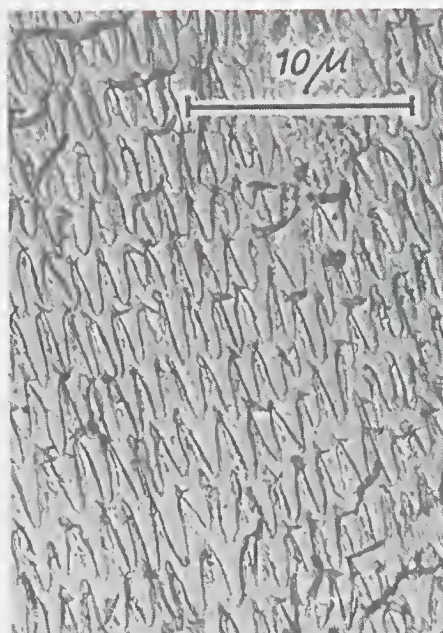
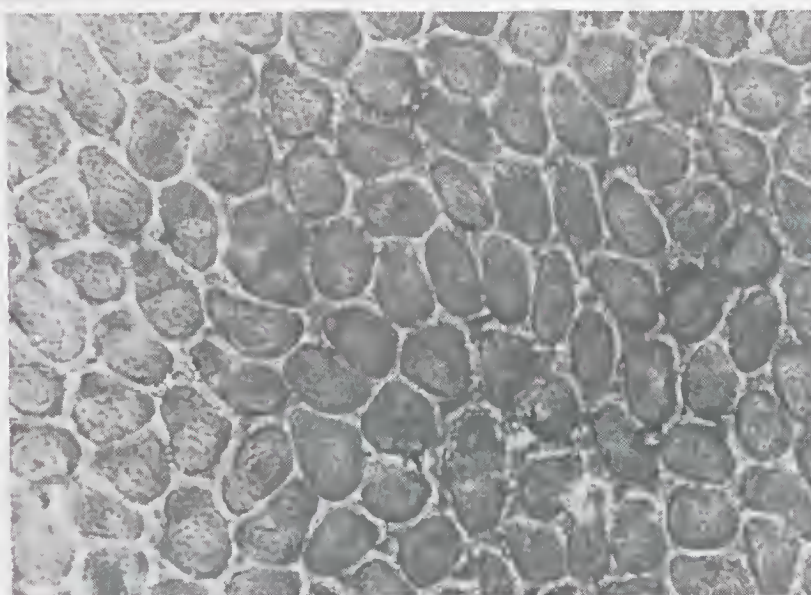



Fig. 44 — *Ditaxodon taeniatus* — Type specimen (Dorsal Electron Micr. x 1,200)

Fig. 45 — *Conophis vittatus* — Type specimen (Dorsal Electron Micr. x 1,200)

Fig. 46 — *Porthidium lansbergii rozei* (Opt. Micr. ± x 200)

Angel (1933) describes a new species of *Agkistrodon* from Annam, *Agkistrodon annamensis*.

Smith (1943) puts *A. annamensis* in the synonymy of *A. rhodostoma.*

Klemmer (1963) mentions *A. annamensis* and *A. rhodostoma* without any coment.

Campden-Main (1970) uses *Calloselasma rhodostoma* for specimens from Vietnam.

Since Boulenger's Catalogue no attempt was made to revive *Calloselasma* except by Chernov (1957) who removed *Calloselasma* from the synonymy of *Agkistrodon* but was not followed by the autors, except Campden Main l.c.

Bürger 1971 in his dissertation for PhD thesis used *Calloselasma* for *rhodostoma* and *acutus*. In 1978 Gloyd formed a new genus for *acutus (Deinagkistrodon acutus)*. In 1981 Hoge and Romano Hoge subdivided *Agkistrodon* "sensu auctores" in several genera: and includes them in a new tribe the *Agkistrodontini:*

Agkistrodon Beauvois 1799 for the American species (3 species)

Calloselasma Cope, 1860 (two species)

Deinagkistrodon Gloyd 1978 (one species)

Gloydius Hoge and Romano-Hoge 1981 nom subst. pro *Halys* Gray 1849 preocupied by *Halys* Fabricius 1803 (seven species).

Hypnale Fitzinger 1843 (three species)

Calloselasma annamensis (Angel)

Annamenian Pit Viper (Fig. 6, 8, 12, 13 and 14)

1875 *Calloselasma rhodostoma;* Morice, Coup d'oeil sur la faune Coch. Franç. Rept.,:67.

1885 *Calloselasma rhodostoma;* Tirant (*partim* ?), Excurs. et Reconnaissance *20*:399 (not seen) fide Saint Girons.

1885 *Calloselasma rhodostoma;* Tirant (*partim* ?), Notes sur les Reptiles et Batraciens de la Conchinchine et du Cambodge, Saigon:37

1933 *Ancistrodon annamensis* Angel, Bull. Mus. Nat. Hist. Nat., Paris, Serie 2 (2), *5*:277, fig. 1.

1936 *Agkistrodon annamensis;* Bourret, Serp. Indo-Chine, :454.

1943 *Ancistrodon rhodostoma;* Smith (*partim*) The Fauna of British India, Ceylon and Burma including the whole of the Indo--Chinese Sub-Region vol. III — Serpentes:497 text fig. 158 A, B and C.

1963 *Agkistrodon annamensis;* Klemmer, Behringwerk-Mitteil. Die Giftschlangen der Erde. (Sonderband) :397.

1968 *Agkistrodon rhodostoma;* Leviton (*partim*), *Venomous Vertebrates.* Acad. Press., *1*, p. 560.

1970 *Calloselasma rhodostoma;* Campden-Main (*partim*), A Field guide to the Snakes of South Vietnam, USNM:96 + text, fig. + maps.

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:81-118, 1980/1981.

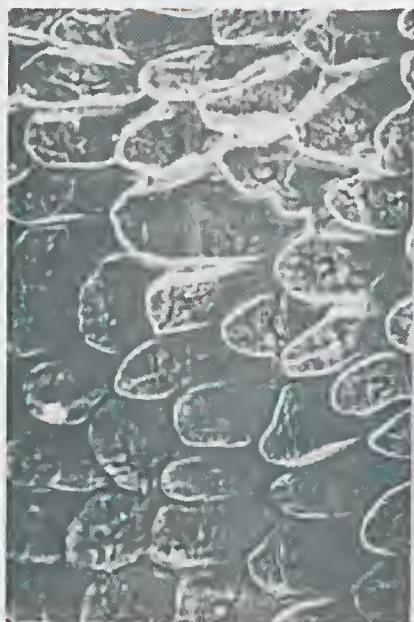
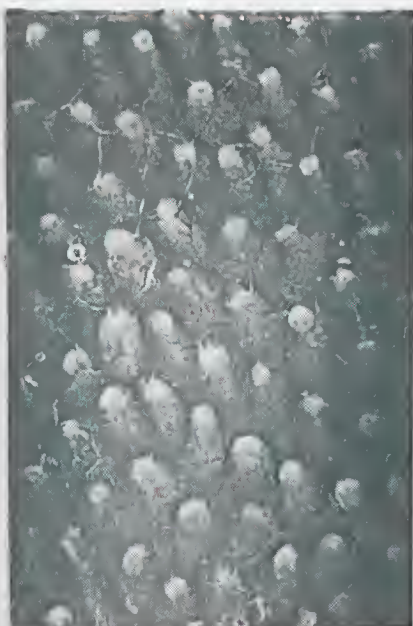
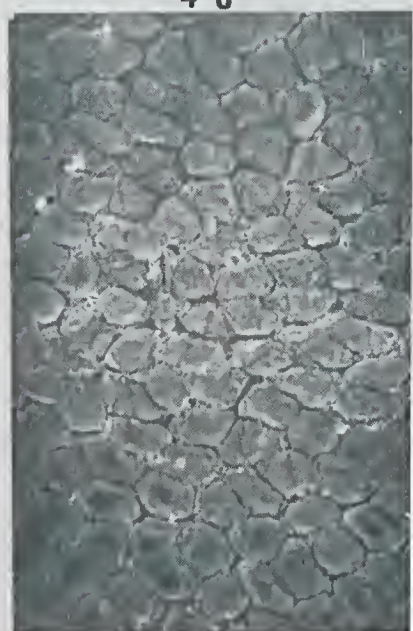



Fig. 47 — *Atheris nitschei nitschei*

Fig. 48 — *Echis carinatus pyramidum*

Fig. 49 — *Vipera lebetina turanica*

Fig. 50 — *Vipera russelli russelli*

All fig. Opt. Micr. ± x 100

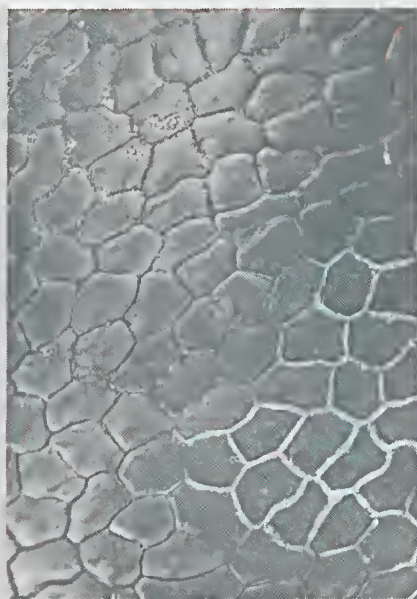
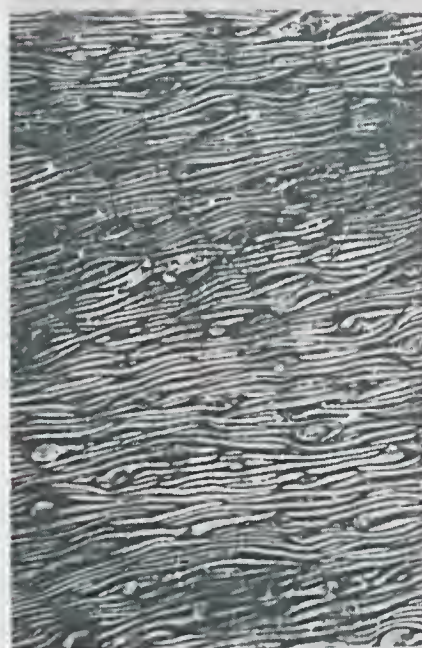



Fig. 51 — *Bothrops moojeni*
Fig. 52 — *Trimeresurus gramineus*
Fig. 53 — *Tropidolaemus wagleri*
Fig. 54 — *Atractaspis irregularis conradsi*

All fig. Opt. Micr. ± x 100

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:81-118, 1980/1981.

1972 *Agkistrodon rhodostoma;* Saint Girons (*partim*), Mem. Mus. Nat. Hist. Nat. Série A Zoologie, *74*:153.

1981 *Calloselasma annamensis;* Hoge and Romano-Hoge, Mem. Inst. Butantan, *42/43*:193, 1978/79 (1981).

Type locality: Vinh-Hoa, Southern Annam Vietnam.

Range: Eastern Cambodge, Southern Annam, Vietnam (map. fig.)

MATERIAL

M.N.H.N.P.Nr. 1933-23, ♀ (Type specimen) from "Sud de l'Annam", Vietnam, col. by the "Mission Citroen"; M.N.H.N.P.Nr. 1887-173, from Tonkin, don. by Heckel; M.N.H.N.P.Nr. 1920-215, ♀ and 1920 A-215 juv. from Cap Saint Jacques, Sud Vietnam, col. by Mignon; M.N.H.N.P.Nr. 1911-67, ♂ and 1911-67, ♀ from Cap Saint Jacques, Sud Vietnam, col. by Chatel; M.N.H.N.P.Nr. 1912-76, ♂ and 1912-79, ♀, from Cambodge col. by Charpentier, M.N.H.N.P.Nr. 1937-30, ♀. Environ de Bien-Hoa Sud Vietnam, col. by Toilane; M.N.H.N.P.Nr. 1970-582 Plantation Krek, Cambodge, col. by Saint Giron; B.M.Nr. 1937-2-1-17, ♀ (bad state of preservation) Nakham between (Uteradit and Paklay N.E. Siam press. by M. A. Smith; B.M.Nr. 1937-2-1-13, O, from N.W. of Raheng Northern Siam; B.M.Nr. 1921-4-1-49, O and 1921-4-1-50, O from Cap Saint Jacques South Vietnam pres. by M. A. Smith; B.M.Nr. (7505), 1968-837, O Cham--Am P. Siam foot of Hill., M. A. Smith pres. B.M.Nr. (8268) 1968-839 O N.W. of Raheng (Rak ng?) (Now Tsheng (=Tak) Thailand, col by Nai Put; B.M.Nr. (2610) 1968-841, O, from Cap Saint Jacques. For the elaboration of the maps following localities where quoted (They where tentatively atributed to *annamensis* on base of geografical localisation): Sakhon Nakon, Prov. Sakon Nakhon, Thailand; Lop Buri, Prov. Lop. Buri, Thailand; Korat (=Nakon Ratchasima) prov. of Nakhon Rachasima Thailand.

Kumpawapi 250 km North of Korat = Nakon Ratschásima) Thailand Lat. 17° 10'N long. 102° 50'E.

Nong Kai; Chiang Mai; Thailand. Laos and the following localities in Vietnam; Phu Rieng, Pham Rang, Loe Ninh, Ben Cat. Xaun Loc, Long Binh, Phu Vinh and Kompong Speu.

DESCRIPTION

Closely related to *Calloselasma rhodostoma* but postocular band indistinct and never festooned (fig. 3, 4, 8 and 21).

Calloselasma rhodostoma Reinwardt in Boie

Malayan Pit Viper

1736 *in* Seba, Thes. 2, pl. 68, fig. 6 (?). Very bad drawing and identification doubtfull.

1801-1809 *in* Russel, Cont. acc. Indian Serpents., *2*, pl. 21:24.

*1827 *Trigonocephalus rhodostoma* Reinwardt in Boie, Isis 1827, *22*:561.

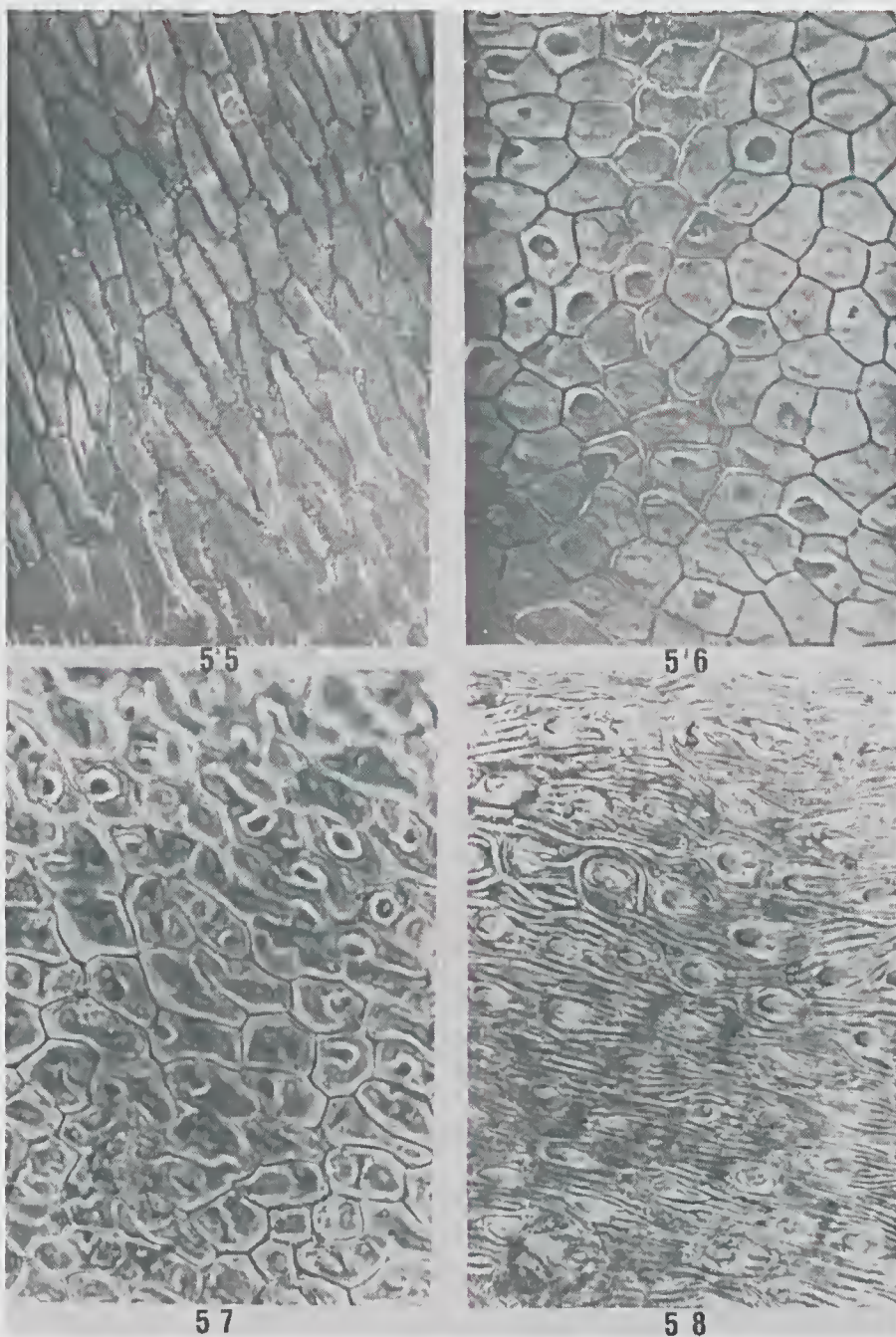



Fig. 55 — *Bothrops moojeni*

Fig. 56 — *Trimeresurus albolabris*

Fig. 57 — *Bothriechis nigroviridis marchi*

Fig. 58 — *Tropidolaemus wagleri*

All fig. Opt. Micr. ± x 200

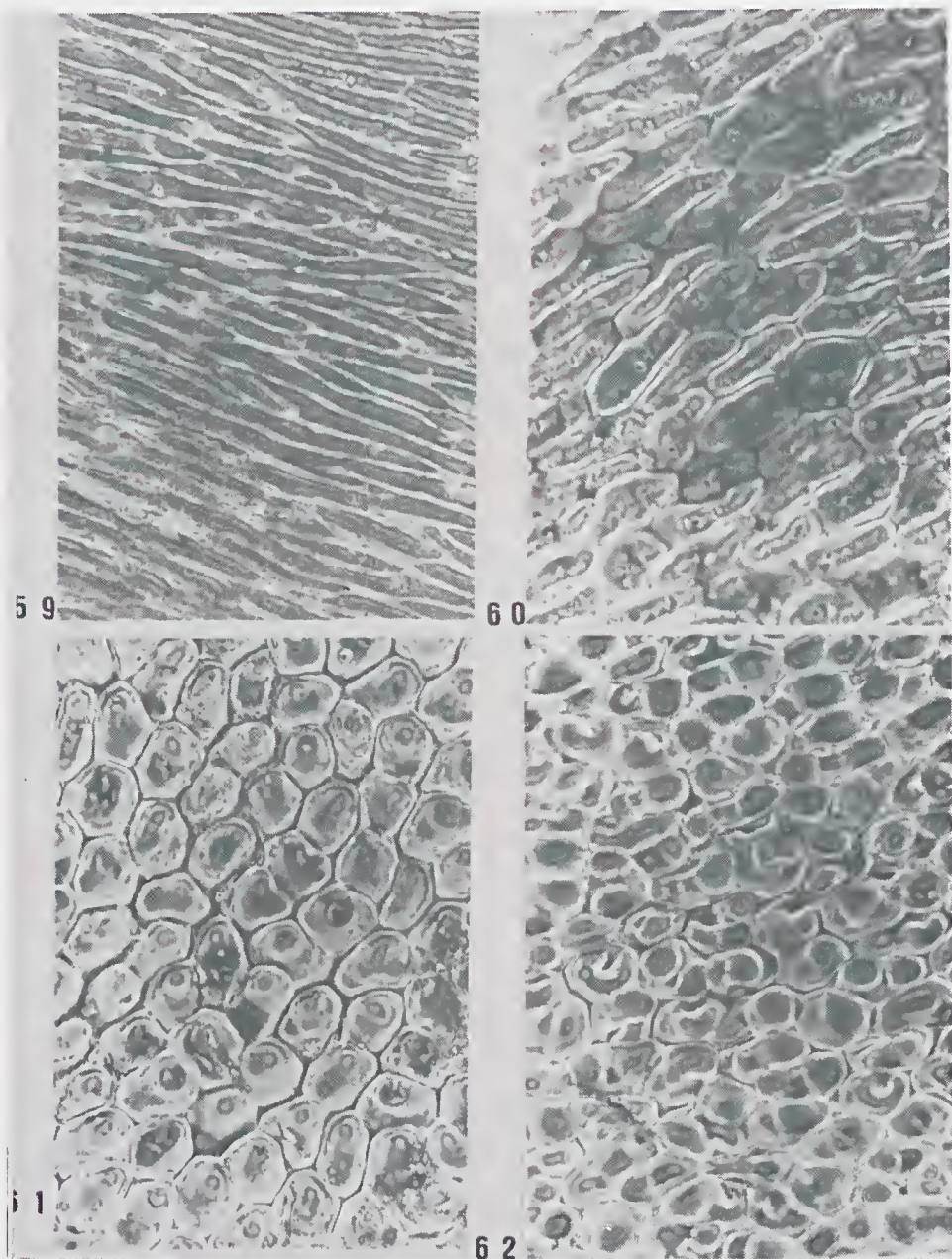



Fig. 59 — *Agkistrodon bilineatus*

Fig. 60 — *Hypnale hypnale*

Fig. 61 — *Deinagkistrodon acutus*

Fig. 62 — *Ovophis okinavensis*

All fig. Opt. Micr. ± x 200

1830 *Trigonocephalus rhodostoma;* Wagler. Syst. Amph.:174.

1832 *Vipera praetexta* Gravenhorst. Deliciae Mus. Vrátisv. *Trigonocephalus praetexta* Hemprich.

1837 *Trigonocephalus rhodostoma;* Schlegel, Essai Phys. Serp. *1*:190, 240 and *2*:547, pl. 20, fig. 1-3.

1843 *Tisiphone rhodostoma;* Fitzinger. Syst. Rep.: 28.

1844 *Trigonocephalus rhodostoma;* Schlegel. Abb. n. Amph. 59-63, 140, pl. 19, fig. 1-10 and pl. 49.

1849 *Trigonocephalus rhodostoma;* Gray, Cat.: 19.

1853 *L[eiolepis] rhodostoma;* Duméril, Mém. Acad. Sc., *23*:534.

1854 *Leiolepis rhodostoma;* Duméril, Bibron et Duméril, Erp Gén. *7*(2):1500.

1859 (1858-1859) *T[rigonocephalus] (Tisiphone, Fitz.), rhodostoma;* Jan, Prodome d'une Iconographie descriptive des ophidiens...:29.

1860 *Calloselasma [rhodostoma];* Cope, Proc. Acad. Sci. Philadelphia (1859):336.
(1861 fide Troschel).

1861 (1860) *Trigonocephalus rhodostoma;* Reinhardt, Herpetologiske Meddelelser.

1863 *(Tisiphone) T[rigonocephalus] rhodostoma;* Jan Elenco sist.:125.

1863 *Tisiphone rhodostoma;* Peters. Mb. Berl. Akad., 1862:673.

1864 *Calloselasma rhodostoma;* Günther, Rept. Brit. India:391.

1870 (1869) *L[eiolepis] rhodostoma;* Westphal-Castelnau, Cat. col. Rept.:|49|.

1872 *Trigonocephalus rhodostoma,* Schlegel, De dierenterin:43 + fig.

1874 *Trigonocephalus rhodostoma;* Jan, Icon. Gén. Ophid livr. 46, pl. 6, fig. 2.

1892 *Ancistrodon rhodostoma;* Boettger, Ber. Off. Verh. Nat., *29/32*:135. (*non vidi*)

1896 *Ancistrodon rhodostoma;* Boulenger, Cat. Snake Brit. Mus., *3*:527.

1902 *Ancistrodon rhodostoma;* Lampe et Lindholm. Jahrb. d. Nass. Ver. f. Nat. *55*:43.

1912 *Agkistrodon rhodostoma;* Barbour, Mém. Mus. Comp. Zool. Harward Coll., *44*:139.

1912 *Ancistrodon rhodostoma;* Boulenger. Vert. Fauna Malay Peninsula, Rept. and Batrachia, :213, fig. 64.

1904 *Ancistrodon rhodostoma;* Annandale, J. Asiat. Soc. Bengal., *73*:207-212.

1914 *Ancistrodon rhodostoma;* Smith, J. Nat. Hist. Soc. Siam., *1*:57-58.

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:81-118, 1980/1981.

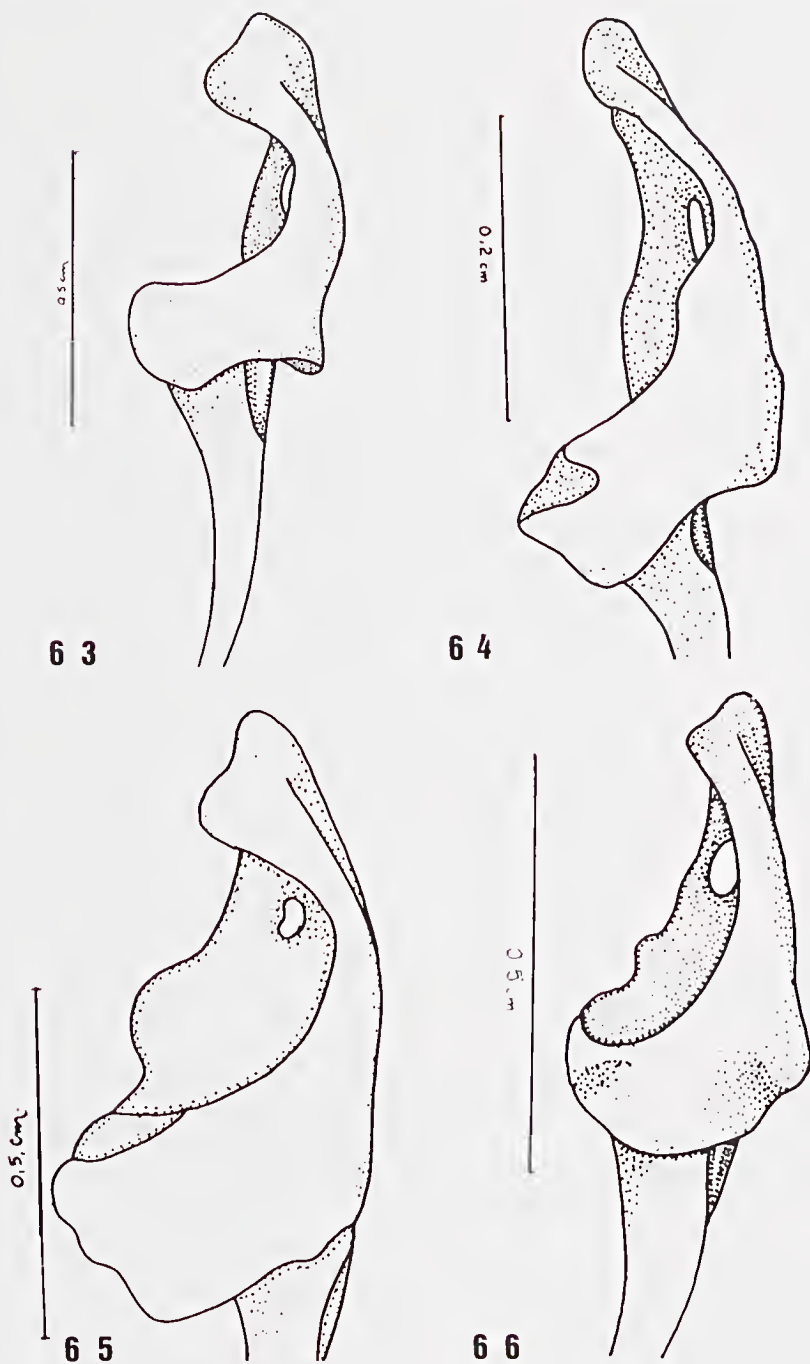



Fig. 63 — Maxillary of *Bothrops lanceolatus*
Fig. 64 — Maxillary of *Trimeresurus gramineus*
Fig. 65 — Maxillary of *Ovophis chaseni*
Fig. 66 — Maxillary of *Porthidium lansbergi*

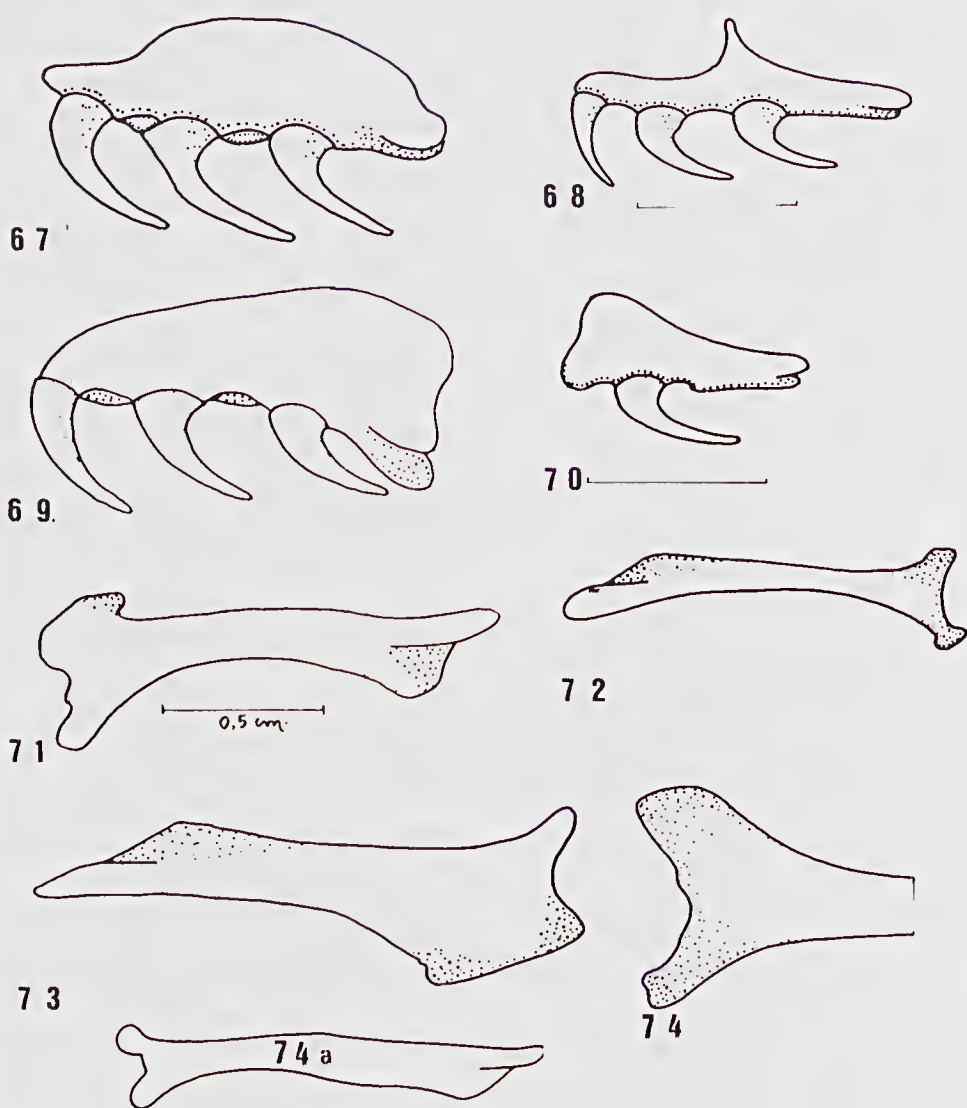



Fig. 67 — Palatine of *Trimeresurus gramineus*
Fig. 68 — Palatine of *Bothrops lanceolatus*
Fig. 69 — Palatine of *Ovophis chaseni*
Fig. 70 — Palatine of *Porthidium lansbergi*
Fig. 71 — Ectopterygoid of *Ovophis chaseni*
Fig. 72 — Ectopterygoid of *Porthidium lansbergi*
Fig. 73 — Ectopterygoid of *Trimeresurus gramineus*
Fig. 74 — Ectopterygoid of *Bothrops lanceolatus*

1915 *Ancistrodon rhodostoma;* Smith, J. Bombay Nat. Hist. Soc., *23*:787-788+Photo.

1916 *Ancistrodon rhodostoma;* Smith, J. Nat. Hist. Soc. Siam., *2*:164.

1916 *Ancistrodon rhodostoma;* Ouwens. De Voorn. Giftsl. Nederl. Cost Indie, 19, pl. 13.

1916 *Ancistrodon rhodostoma;* Gyldenstolpe, Handl. Sven. Akad. Stockolm, *4*(3):27, Mus. Singapure.

1917 *Ancistrodon rhodostoma*; de Rooij Rept. Ind. Austr. Archip., *2*, Ophidia 279, figs. 114-115.

1930 *Agkistrodon rhodostoma*; Smith, Bull. Raffles, *3*:[89].

1930 *Agkistrodon rhodostoma*; Cochran, Proc. U.S.N. Mus., *77*:37.

1934 *Agkistrodon rhodostoma*; Brongersma, Zool. Med. Rijksmuseum Nat. Hist. Leiden, *17*:161-251.

1934 *Agkistrodon rhodostoma*; Mertens, Arch. f. Hydrobiologie (Supl.) *12*:Trop. Binnengew., *4*:677-701.

1936 *Agkistrodon rhodostoma*; Bourret, Serp. de L'Indo-Chine:45.

1953 *A[gkistrodon] rhodostoma*; Cochran, Smiths. Inst. war back. stud. n.º (10):21.

1943 *Ancistrodon rhodostoma* Smith (*partim*), Fauna India, Rept. and Amph., *3*:497.

1944 *Agkistrodon rhodostoma*; Cochran. From the Smithsonian report for 1943 (public. 3753):275-324 + 23 pl. Washington D.C. Un. Stat. Gov. printing offices.

1945 *A[gkistrodon] rhodostoma*; Loveridge. Rept. o.t. pacific world:178-180.

1950 *Agkistrodon rhodostoma*; Haas, Treubia, *20*:608.

1954 *Ancistrodon rhodostoma*; Tweedie. The Snakes of Malaya, Singapure, :114.

1957 *Calloselasma rhodostoma*; Chernov. Zool. J., *36*(5):792.

1958-1958 *Agkistrodon rhodostoma*; Taylor et Ebbel, Univ. Kansas, Sci. Bull., *38*,(2) n.º 13:1168.

1959 *Agkistrodon rhodostoma*; Hoesel, Ophidia Javanica, *1*:1-88, figs. 122-123.

1959 *Agkistrodon rhodostoma*; Mertens, Treubia., *25*,(1).

1961 *Agkistrodon rhodostoma*; Deuve Bull. Soc. Sci. Nat. Laos n.º 1:30.

1962 *Agkistrodon rhodostoma;* Deuve, Bull. Soc. Sci. Nat. Laos (2):81.

1962 *Agkistrodon rhodostoma;* Deuve, Bull. Soc. Sci. Nat. Laos (2):88.

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:81-118, 1980/1981.

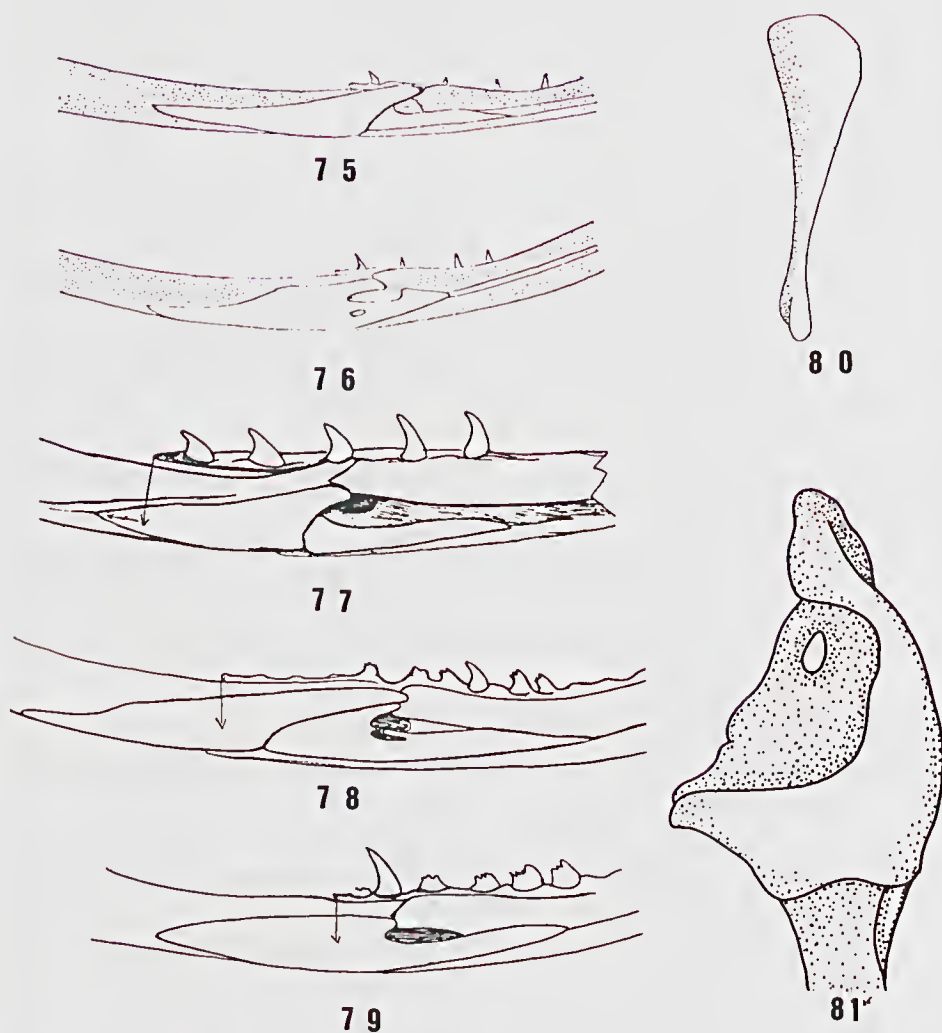



Fig. 75 — *Bothrops atrox*
Fig. 76 — *Porthidium lansbergi*
Fig. 77 — *Agkistrodon piscivorus*
Fig. 78 — *Deinagkistrodon acutus*
Fig. 79 — *Gloydius blomhoffii*
Fig. 80 — *Protobothrops flavoviridis*
Fig. 81 — *Protobothrops jerdoni*

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:81-118, 1980/1981.

Fig. 82 — *Calloselasma rhodostoma*

Fig. 83 — *Gloydius blomhoffii*

Fig. 84 — *Hypnale hypnale*

1962 *Agkistrodon rhodostoma;* Deuve, Bull. Soc. Sci. Nat. Laos (2):77, 78, 79, 81.

1962 *Agkistrodon rhodostoma;* Deuve, Bull. Soc. Sci. Nat. Laos (3):20.

1962 *Agkistrodon rhodostoma;* (*partim*), Depart. Navy ONI Study *3-62*:126.

1963 *Agkistrodon rhodostoma;* Klemmer, Behringwerke Mitt. Sonderb.:401.

1965 *Agkistrodon rhodostoma;* Taylor, (*partim*), Univ. Kansas Sci. Bull., *45*, (9):1058, fig. 120.

1968 *Agkistrodon rhodostoma;* Leviton, (*partim*), Ven. Vertebrates. Acad. Press., *1*:560.

1971 *Calloselasma rhodostoma;* Burger (*partim*), Genera of Pit Vipers. PhD. diss. Publ. microf. Ann. Arbor:100, fig. 4b.

1972 *Agkistrodon rhodostoma;* Saint Girons (*partim*), Mem. Mus. Nat Hist. Nat. Série A — Zoologie *74*:153, pl. 41 + map.

1978 *Calloselasma rhodostoma;* Gloyd (*partim*), Proc. Biol. Soc. Washington, 963.

1981 *Calloselasma rhodostoma;* Hoge and Romano-Hoge, Mem. Inst. Butantan, *42/43*:193, 1978/79 (1981).

TYPE LOCALITY: Djawa.

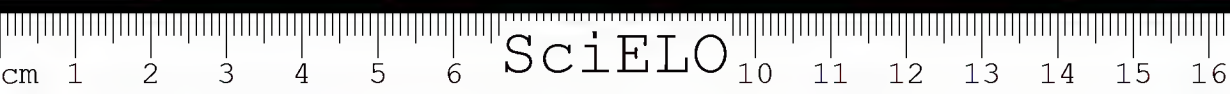
RANGE: Malaysia south of Isthmus of Kra and Djawa: a few specimens known from Thailand and Cambodge, Saint Girons collected both *C. rhodostoma* and *C. annamensis* at Kreck, Cambodge.

The species seems to be abscent in Sumatra (a specimen in the collection of the RMNHL Nr.11454 leg. Dubois is labelled Sumatra without any other data; two more specimens, leg. P.GNiel.Nr.20392 and 20393 also are labelled Sumatra). In 1896 Boulenger in his Catalogue noticed only specimens from Java and a single one as being from Siam with? (actually BMNr.62.11.1.243). The first specimens without doubt from Siam are those collected by Annandale and Robinson in Perak and the Siamese Malay States and identified by Boulenger who prepared list of Malayan reptiles. He confirms the occurance of *A. rhodostoma* in Siam whence a specimen has been received by the Christiana Museum and also records the species for Biserat. A parallel case of discontinuous distribution is afforded by *Geoclemys subtrijuga* and several other species, as already stated by Boulenger and Barbour 1.c.

All the specimens seen by Boulenger are still in the herpetological collection of the British Museum belong to the species *C. rhodostoma* and not a single one to the species *C. annamensis*.

MATERIAL:

M.N.H.N.P.Nr.411 a ♀ and 411A, a ♂, from Batavia, col. D'Istria; M.N.H.N.P.Nr.576 (2 spec.) from Java, col. Quoy and Gaimard; M.N.H.

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:81-118, 1980/1981.

N.P.Nr.7761 from Java, col. Leschenault; M.N.H.N.P.Nr.4045 and 4046, from Java, col. Bleeker; M.N.H.N.P.Nr.1893-124, ♂, from "Prov. de Bangtaban" Malayan peninsula, col. Bel; B.M.Nr.(1834-MAS) 1968-838, head only; B.M.Nr.(6322) 1968-840 from KHAORAM (food of Hill); B.M.Nr.(1835-MAS); 1968-843 Hupbon B.M.Nr.(7165) 1968-842 from Nong SE Siam; B.M.Nr.(1833) 1939 a ♂ from Bangnara; B.M.Nr.1885, 12.31.31 a ♂ from Wellus Mountains Kediri, Java 5000 ft.; by Baron v.Hnegal; B.M.Nr.62.11.1. 243 a ♀ from Siam; B.M.Nr.1879.16.2 a 13 and 1879.16.20.14 from Java pres. A. Scott; B.M.Nr.66.8.14.316 a ♀ from Java; B.M.Nr.1903.4.13.98, ♀, and 1903.4.13.100 from Jahor Malayan peninsula; B.M.Nr.1891.5.1.16 a, ♀, and 1891.5.1.17 ♂, from Batavia; B.M.Nr.44.2.22.47, ♀ pres. Leyden Mus.; B.M.Nr.1915.5.13.13, ♂, from Bantaphan Siam col. Malcon Smith; B.M.Nr.1969 from Sve Umbel col. Malcom Smith 1918 R.M.N.H.L.Nr.318 (3 spec.) from Java? leg. Boie and Macklat; R.M.N.H.L.Nr.1509 from Java, leg. S. Muller; R.M.N.H.L. Nr.1510 from Java leg. C.G.C. Reinwardt R.M.N.H. from Buitemorg leg van Slooten; R.M.N.H.Nr.5808 from Babakan Djatti, Res. Krawang Java leg. W.V. van Heurn; R.M.N.H.L.Nr.7433 (2 spec.) from Botanical Garden, leg Kannegieter; R.M.N.H.L.Nr.7474 (4 spec.) from Radjamala, W. Java, leg J. Semmelink. R.M.N.H.L.Nr.7490 (2 spec.) from Buitenzorg Java leg. Buitendijk R.M.N.H.L.Nr.8013 (1 spec.) from Buitenzorg, Java. R.M.N.H.L.Nr.8969 (2 spec.) from Indramajoe, W. Java, leg. F. Kopstein (not seen!); R.M.N.H.L.Nr.9736 (2 spec) from Depak near Batavia Nature Reserve (now Depok near Djakarta Djawa); R.M.N. H.L.Nr.10134 (2 spec.) from Java leg. Tegelaar; R.M.N.H.L.Nr.10319 (2 spec.); from Malong Java; R.M.N.H.L.Nr.11454, from Sumatra, (now Sumatera), leg. Dubois; R.M.N.H.L.Nr.20381 from Surroundings of Buitenzorg, leg P. Buitendijk; R.M.N.H.L.Nr.20382 from Buitenzorg leg P. Buitendijk; R.M.N.H.L.Nr.20383 and 20384 from Buitenzorg leg F. Verbeek; R.M.N.H.L.Nr.20385 from Dessa Sambengwangon, Rembang Java leg Fr. Verbeek; R.M.N.H.L.Nr.20386 (6 spec.) from Radjamandala, Bandoeng, W. Java leg F. Kapstein; R.M.N.H.L.Nr.20391 (no data); R.M.N.H.L.Nr.20392 and 20393 from Sumatra leg P.G. Neeb; R.M.N.H.L. Nr.20394 from Java; R.M.N.H.L.Nr. 20395 from Buitenzorg; R.M.N.H.L. Nr.20396 from Bandoeng, W. Java leg E. Jacobson; 20397 and 20398 from Tandji near Semarong Java leg P. Buitendijk. I.B.H.Nr.31 Java (gift from Königl. Natur. Sammlung in Stuttgart, (1912); I.B.H.Nr.19216 Java, gift from I.R.S.N. Belgique; I.B.H.Nr.19227; Java I.R.S.N. Belgique; I.B.H.Nr. 4234 from Buitenzorg, Java leg T. Barbour. In lit. Barbour (1912) Buitenzorg. Gunung Bundes on Mt. Salak 2200 ft am Daru in Bantam.

DESCRIPTION

Snout pointed, somewhat turned up; rostral as high as broad or slightly higher, internasals a little longer than broad, shorter than the prefrontals; frontal as long, or longer than its distance to the tip of the snout, longer than broad, as long or a little longer than the parietals; parietals slightly longer than broad; 3 preoculars; a loreal between the upper preocular and posterior nasal; a large subocular separating the eye from the upper labials; loreal pit not in contact with upper labials;

1 or 2 postoculars; 7 to 9 upper labials; all cephalic shields and scales smooth; dorsals in (23-25) — (21-17) longitudinal rows all smooth 138-157 ventrals in males, 157-166 in females; 34-46 pairs of subcaudals in females and 45-55 in males.

Reddish brown with a series of dark brown, black edged spots opposite to one another or alternating; generally a black vertebral line, interrupted or not; the spaces between the dorsolateral spots are distinctly lighter in color, sometimes ill defined darker marking in the light interpaces. Belly white to yellowish, powdered or not with dark brown on the borders of ventrals and two outer dorsals series of dark, sometimes indistinct roundish dots. A broad dark brown band from the eye to the angle of mouth. Black edged, always festooned below (fig. 20). Sometimes upper and lower black edges rimmed with light yellow.

The juveniles have brighter colors than the adults (fig. 26); vivarious yellow tails. When aging, small dark spots appear on the dorsal surface; the spots spread gradually sidewards leaving the yellow color indefined in the adult.

Total length 1030 mm.

This species is mainly found in heavily forested areas.

ARTIFICIAL KEY TO THE *Agkistrodontini* *

I. Dorsal scales smooth (fig. 22) .... *Calloselasma*

II. Dorsal scales keeled.

A — Praefrontals and internasals broken up in scales (fig. 18); dorsal scales in 17 rows; snout turned up (fig. 16)... *Hypinale.*

B — Praefrontals and internasals not broken up in scales; dorsals not in 17 rows.

1. Snout with a distinct dermal appendage (fig. 17); scales of the lowermost row near the tip of tail much higher than long (fig. 23) .... *Deinagkistrodon*
2. Snout and scales near the tip of tail not as above; (fig. 24 and 25).
   a) All subcaudals paired; loreal pit always separated from labials .... *Gloydius*
   b) Anterior subcaudals single; loreal pit generally bordered by a labial .... *Agkistrodon*

KEY TO THE SPECIES OF *Calloselasma*

1. The postocular dark band very distinct, black edged and always festooned (fig. 9 and 20) .... *rhodostoma*

2. The postocular dark band indistinct not festooned below (fig. 8 and 21) .... *annamensis*

* In case of doubt on any characters check skull, if:
1. Short and broad; supratemporal extending beyond the brain case = *Agkistrodon*.
2. Long and narrow; supratemporal not extending beyond the brain case = *Gloydius*.

HOGE, A. R. & ROMANO HOGE, S. A. Notes on micro and ultrastructure of "Oberhäutschen" in Viperoidea. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:81-118, 1980/1981.

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks go to several institutions and persons for loans or permission to study the specimens namely: (C. Myers; R. G. Zweifel) American Museum of Natural History; (G.R. Zug) Smithsonian Institution; (Alice Grandisson) British Museum Natural History; To Knoll-Twyford Laboratories at Ludwigshafen, Germany for the permission to examine the alive specimens. To Miss Alma Yasodhara Alexandra Hoje for technical aid helping the examination of the Knoll-Twyford and M.N.H.N. Paris specimens and redaction of manuscript. To João Domingues Cavalheiro for redrawing the figs. 20-25. Our special thanks to Dr. E.R. Brygoo for his invitation and Mrs. Brygoo for the photographs of specimens (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris) and to Dr. M.S. Hoogmoed Rijksmuseum van Natuurlijke Historie, Leiden, who kindly checked the shape and form of postocular band in all available specimens in the Rijksmuseum van Natuurlijke Historie, Leyden. We are also indebted to the: Application laboratory, Naka works of the Hitachi, Ltd of Tokyo, Japan for photographs with scanning microscope.

RESUMO: Descrição de uma técnica nova para o estudo microscópico da "oberhäutschen"; descrição de um gênero novo: *Protobothrops*; os gêneros, *Porthidium*, *Bothriechis* e *Bothriopsis* são considerados distintos de *Bothrops*; uma diagnose sumário dos *Agkistrodontini* e redescrição de *Calloselasma rhodostoma* e *Calloselasma annamensis*.

PALAVRAS-CHAVE: "Oberhäutschen"; Viperoidea; *Protobothrops*; *Porthidium*; *Bothriechis*; *Bothriopsis*; *Agkistrodontini*; *Calloselasma rhodostoma*; *Calloselasma annamensis*.

Mem. Inst. Butantan
44/45:119-126, 1980/81

ABSENCE OF E-ROSETTE-POSITIVE CASES IN A SERIES OF 17 CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOID LEUKEMIA FROM SÃO PAULO, BRAZIL [1,2]

L. DENARO-MACHADO [3]
J. C. MACHADO [3]
A. G. AMARAL [4]
M. I. ESTEVES [3]
A. BIANCHI [4]
M. L. D'ANDREA [4]

ABSTRACT: A study on 17 children from the São Paulo State (Brazil) with Acute Lymphoid Leukemia (ALL) was performed in order to correlate the socioeconomic condition of the patients with the immunological typing, besides data on the clinical evolution of the disease. The most significant finding was the absence of T-cell proliferation in all cases. These findings can be compared with those of other countries.

KEYWORDS: Brazilian children, Acute Lymphoid Leukemia, Immunological markers, Leukemic epidemiology.

ABBREVIATIONS

Acute Lymphoid Leukemia (ALL); High Risk (HR); Standard Risk (SR); White Blood Cell (WBC); Central Nervous System (CNS); E — Rosette — Positive (E); Surface Immunoglobulin (sIg); Sheep Red Blood Cells (SRBC).

INTRODUCTION:

In order to supply support for the comparison of the relative frequency of different morphological types of leukemia in children of several countries plus aspects related to the membrane markers associated to

1. Research Support: CNPq, FEDIB and DINECRODE.
2. This work was presented on the International Workshop on the influence of the environmental on leukemia and lymphoma, May 1982, NIH, Bethesda-Maryland, USA.
3. Instituto Butantan — Laboratório de Citopatologia — Divisão de Patologia.
4. Instituto Central — Hospital A. C. Camargo (Fundação Antonio Prudente).

other clinical data, and socioeconomic conditions of the patients, the AA completed studies on 17 children from the "Serviço de Pediatria" of the Hospital A.C. Camargo from São Paulo City, Brazil.

The São Paulo State is localized in the southern region of Brazil, of a temperate climate. It is proven to be the State of highest economical development of the Country, to which a high number of immigrants arrive from several adjacent States as well as from the Brazilian Northeast. This condition determines relevant local socioeconomic disleveling.

MATERIAL AND METHODS

The present study was restricted to 17 children, carriers of ALL, the ages varying from 8 months to 13 years, selected after admission in the Hospital, between October 1979 and June 1981.

Identification data of the patients are summarized in Table 1. Most of the patients originate from peripheric areas of the City of São Paulo, and therefore from populational socioeconomical less privileged classes. The Assistant Service of the Hospital A.C. Camargo informed that 16 of them came from social classes provided with social security, and one (case 9) was considered indigent.

Table 2 summarizes the clinical and laboratorial data of the patients as well as diagnosis, classification in HR-ALL, and SR-ALL, and survival. The data relative to WBC/mm³ represent those obtained at the moment of admission of the patients. The percentage of blasts in the peripheral blood varied between 1% (case 4) to 83% (case 16), and in bone marrow from 6% (case 4) to 94,4% (case 2). These blasts were counted on the same day (in the case of peripheral blood) or on one of the proximate days (in the case of bone marrow) of the blood sampling collected for immunological tests.

The clinical-laboratorial data concerning the presence of one or more of the following characteristics: WBC/mm³ > 100.000; presence of mediastinal mass; CNS infiltration; proliferation of type E-rosette-positive, and induction failure to remission on the 30th day, were the parameters demonstrative for the diagnosis of an HR-ALL. Obviously, the absence of these characteristics implies a SR-ALL.

The immunological tests performed refer to the typing of peripheral blood lymphocytes after the treatment by the Ficoll-Hypaque gradient method. Such tests were restricted to the determination of the T-lymphocyte population by the spontaneous rosette formation with SRBC, and by the identification of surface immunoglobulins for the enumeration of B-lymphocytic population by using of polyvalent fluorescent antiserum, as well as fluorescent antiserum for the heavy chains of immunoglobulin (IgG and IgM). The results were compared with the values obtained from 9 volunteer healthy donnors, as shown in Table 3.

By the current knowledge, it is known that such tests do not suffice for a more exact typing of leukemias, we believe however, that they are adequate for a comparison with other equivalent works.

TABLE 1 — Identification of the patients under study

Case N.º	Age	Sex	Ethnic Group	Procedence	Socio-Economic Status
01	3 y	F	Black	Guarujá (SP) (3)	Covered by social security
02	6 y	F	Caucasian	Itaquera (SP) (1)	”
03	4 y	M	Caucasian	Sto. André (SP) (2)	”
04	4 y	M	Caucasian	V. Gustavo (SP) (1)	”
05	8 mo	F	Caucasian	SP (SP) (1)	”
06	8 y	F	Caucasian	Itapevi (SP) (1)	”
07	9 y	F	Caucasian	Sto. Amaro (SP) (1)	”
08	4 y	M	Caucasian	Sto. André (SP) (2)	”
09	4 y	M	Caucasian	Tupã (SP) (3)	”
10	2 y	M	Caucasian	SP (SP) (1)	”
11	7 y	F	Caucasian	Embu (SP) (2)	”
12	3 y	M	Black	C. Patriarca (SP) (1)	”
13	6 y	M	Caucasian	Divinolândia (SP) (3)	Not covered by social security
14	3 y	F	Caucasian	Guaianazes (SP) (1)	Covered by social security
15	5 y	M	Caucasian	S. Bernardo (SP) (2)	”
16	11 y	M	Caucasian	Marília (SP) (3)	”
17	13 y	F	Black	S. Domingos (SP) (1)	”

1 — Areas from the periphery of the city of São Paulo
2 — Villages of the great São Paulo
3 — Villages of the interior of São Paulo

TABLE 2 — Clinical and Laboratorial data related to the patients under study

Case N.º	WBC/mm³	Presence Of Mediastinal Mass	Infiltration Of The CNS	Induction Failure	Diagnostic And SR/HR	Survival
01 *	8.300	—	—	+	SR — ALL	11 mo
02	12.150	—	—	—	SR — ALL	13 mo
03	7.600	—	—	—	SR — ALL	Alive
04 **	6.200	—	—	—	SR — ALL	1 mo
05	138.000	—	—	+	HR — ALL	19 mo
06	9.400	—	—	—	SR — ALL	Alive
07 *	4.600	—	—	+	SR — ALL	Alive
08 *	33.000	—	—	+	SR — ALL	15 mo
09	11.100	—	—	—	SR — ALL	Alive
10	2.900	—	+	—	HR — ALL	Alive
11 *	59.000	—	—	+	SR — ALL	Alive
12	3.300	—	—	—	SR — ALL	Alive
13	12.400	—	+	+	HR — ALL	Alive
14	72.100	+	—	—	HR — ALL	Alive
15 **	16.200	+	—	+	HR — ALL	4 mo
16	19.800	+	—	+	HR — ALL	Alive
17 *	60.100	—	—	+	SR — ALL	Alive

* Children initially classified as SR, who presented however, induction failure, and therefore were considered, for therapeutic and prognostic purposes, as HR.
** Children previously treated in another Center, and admitted at the Hospital, in relapse.
SR = Standard Risk
HR = High Risk
Survival until 03.04.82

DENARO-MACHADO, L.; MACHADO, J. C.; AMARAL, A. G.; ESTEVES, M. I.; BIANCHI, A. & D'ANDREA, M. L. Absence of E-Rosette-Positive cases in a series of 17 children with acute lymphoid leukemia from São Paulo, Brazil. *Inst. Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:119-126, 1980/81.

TABLE 3 — Minimal and maximal values of the typing of peripheral blood lymphocytes from 9 volunteer healthy donors

% E Rosette positive cells	% of sIg positive cells	% of non-T, non-B cells
28 — 58	22 — 25	17 — 50

RESULTS AND DISCUSSION

Table 4 shows the results of the lymphocyte typing tests, as well as the immunological interpretation of these data, correlating them with the HR-ALL and SR-ALL diagnosis.

Of the 17 cases presented in Table 4, we verified that the majority (15/17) presented low values for both T-cell and B-cell populations, and consequently a high percentage of "Non-T, Non-B" cells, at least with respect to the employed tests. By the joint analysis of Table 2 and 4, we may conclude that these cases constitute a heterogeneous group as to the evolution of the disease.

Three of these non-T, non-B cases (cases 14, 15, 16) were carriers of tumoral mediastinal mass, a factor considered by Chessells et al. (1977) (2) as associated to a poor prognosis, and suggestive of a T-ALL type of immature cells, even when during the typing they were classified as a Null-cell type proliferation. Actually, two of these 3 cases had a failure in the induction to remission (cases 15 and 16), one of which (case 15) with a survival on only 4 months, a fact that can reiterate the affirmation of those authors, as to a poor prognosis of these cases when associated to the presence of mediastinal tumoral mass.

Monoclonal B-cell type proliferation in ALL are referred to in the literature as a group poorly represented (about 5% of the cases) and characterized by a poor prognosis. One of the 17 cases studied (case 13), classified as HR-ALL by the CNS infiltration and induction failure to remission, presented itself immunologically as a B-cell type proliferation, monoclonal IgG.

Unexpectedly, one of the cases of our series (case 1) presented E-rosette and sIg values within the patterns considered by us as normal (Tbl.3). For this case, denominated by us as "Undeterminable" (U), one of the plausible interpretations would be perhaps the low percentage of blasts within the peripheral blood (7%), although in other cases with such a percentage, or less, the definition of the type of proliferation implicated in the process had been possible.

On the other hand, the literature related about 25% of ALL cases as being of type T-cell proliferation, by the expression of receptor for SRBC, or expression of T-cell antigens (1, 3, 5) being these cases of a poorer prognosis than the "Null" type proliferation. There are authors who relate (4) that T-cell proliferations seem to constitute the largest contingency of ALL in populations of less privileged socioeconomic classes.

In our limited sample of 17 ALL cases of children coming from different areas of the São Paulo State, no type T-cell proliferation could be detected, at least with respect to the ability to form spontaneous rosettes with SRBC, a fact called to attention by the authors as a possible implication with an environmental sociogeographical distribution as well as with etiological factors peculiar to this area.

DENARO-MACHADO, L.; MACHADO, J. C.; AMARAL, A. G.; ESTEVES, M. I.; BIANCHI, A. & D'ANDREA, M. L. Absence of E-Rosette-Positive cases in a series of 17 children with acute lymphoid leukemia from São Paulo, Brazil. *Inst. Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:119-126, 1980/81.

TABLE 4 — Results of the immunological typing from patients under study

Case N.º	Diagnosis and Risk	% of E Rosette Positive Cells	% of sIg Positive Cells	% of IgG Positive Cells	% of IgM Positive Cells	% of non-T non-B Cells	Immunological Interpretation
01	ALL — SR	35	26	9	19	39	U
02	ALL — SR	6	2	2	0	92	N
03	ALL — SR	2	3	4	1	95	N
04	ALL — SR	19	14	5	9	67	N
05	ALL — HR	2	4	0	2	94	N
06	ALL — SR	12	5	2	0	83	N
07	ALL — SR	25	16	10	9	59	N
08	ALL — SR	22	6	9	4	72	N
09	ALL — SR	15	5	3	2	80	N
10	ALL — HR	5	23	20	11	72	N
11	ALL — SR	33	13	8	9	54	N
12	ALL — SR	5	14	5	8	81	N
13	ALL — HR	0	70	63	9	30	BIgG
14	ALL — HR	33	10	8	4	57	N
15	ALL — HR	2	5	2	3	93	N
16	ALL — HR	3	5	3	2	92	N
17	ALL — SR	2	22	6	16	76	N

U = undeterminable; N = cases expressing a great % of non-T, non-B cells

DENARO-MACHADO, L.; MACHADO, J. C.; AMARAL, A. G.; ESTEVES, M. I.; BIANCHI, A. & D'ANDREA, M. L. Absence of E-Rosette-Positive cases in a series of 17 children with acute lymphoid leukemia from São Paulo, Brazil. *Inst. Mem. Inst. Butantan, 44/45*:119-126, 1980/81.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was undertaken with the aid of CNPq, FEDIB, and DINECRODE — MS.

The authors wish to thank Dr. I.F. Souza (Chefe do Serviço Social) of the Hospital A.C. Camargo.

RESUMO: Um estudo em 17 crianças do Estado de São Paulo (Brasil) com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) foi realizado, de forma a correlacionar a condição sócio-econômica dos pacientes com a tipagem imunológica, ao lado de dados de evolução clínica da doença. O achado mais significante foi a ausência de proliferação celular T em todos os casos. Esses achados podem ser comparados com aqueles de outros países.

PALAVRAS-CHAVE: Crianças brasileiras; Leucemia linfóide aguda; Marcadores imunológicos; Epidemiologia leucêmica.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. BORELLA, L. & SEN., L. T Cell surface markers in lymphoblasts in untreated acute lymphocytic leukemia. *J. Immunol., 111*:1257, 1973.
2. CHESSELLS, J.M.; HARDISTY, R.M.; RAPSON, N.T. & GREAVES, M.F. Acute lymphoblastic leukaemia in children: classification and prognosis. *Lancet, 2*:1307, 1977.
3. GREAVES, M.F.; KULEMKAMPFF, J.; PIPPARD, M. & WELSH, K. Differentiation linked expression of p[28,33] (Ialike) structure on human leukemic cells. *Brit. J. Haematol., 37*:391, 1977.
4. RAMOT, B. & MAGRATH, I. (Personnal Communication): Hypothesis: The environment is a major determinant of the immunological sub-type of lymphoma and acute lymphoblastic leukemia in children.
5. PAPAMICHAEL. M.; BROWN, J.C. & HOLBOROW, E.R. Immunoglobulins on the surface of human lymphocytes. *Lancet, 2*:850, 1971.

Mem. Inst. Butantan
44/45:127-131, 1980/81

NEOFORMAÇÃO DE LINFONODOS E ASPECTOS MORFOLÓGICOS CONFUNDÍVEIS COM A ASSIM CHAMADA DEGENERAÇÃO GORDUROSA OU LIPOMATOSE DESSAS ESTRUTURAS *

Jesus Carlos MACHADO
André L. Carmo GASPARINI
Thereza Cristina MACHADO

RESUMO: Os autores apresentam a interpretação que julgam mais adequada para os aspectos histológicos da assim chamada "degeneração adiposa" dos linfonodos. Concluem que a seu ver trata-se na realidade de aspectos sugestivos de neoformação de linfonodos erroneamente interpretados como aspectos "degenerativos" lipomatosos.

PALAVRAS-CHAVE: Degenerações. Linfonodos. Linfoadenopatias.

I. INTRODUÇÃO

A nossa experiência no exame de milhares de linfonodos retirados em esvaziamentos cirúrgicos como recurso terapêutico para exerese ou prevenção de metástases tumorais, leva-nos questionar sobre a real natureza da maioria dos aspectos histológicos diagnosticados como sendo degeneração gordurosa dos linfonodos. Aquele mais característico e curioso que permite ao anatomopatologista, durante um exame de congelação intracirúrgico ou na rotina de peças cirúrgicas, realizar macroscopicamente o citado diagnóstico de atrofia gordurosa é o do tecido linfóide de dispor em forma de meia-lua envolvendo área nodular de tecido adiposo. Outro aspecto, neste caso microscópico, que leva o anatomopatologista a fazer esse diagnóstico é o de por vezes o tecido adiposo encontrar-se junto com o linfático, envolvido por cápsula fibrosa formando verdadeiro linfonodo.

A interpretação cuidadosa de tais achados histológicos comparados com aspectos histogenéticos e embrionários, relacionando-os com a neoformação no adulto de tecido linfóide, permite-nos a nosso ver afirmar

* Trabalho realizado, em colaboração, pelos Departamentos de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo (Fundação Antonio Prudente) e Divisão de Patologia do Instituto Butantan. Auxílio do FEDIB, FUNDAP e Comissão Nacional de Linfomas Malignos e Ministério da Saúde.

MACHADO, J. C.; GASPARINI, A. L. C. & MACHADO, T. C. Neoformação de linfonodos e aspectos morfológicos confundíveis com a assim chamada degeneração gordurosa ou lipomatose dessas estruturas. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:127-131, 1980/81.

que a maioria das assim chamadas "degenerações gordurosas" dos linfonodos nada mais são do que aspectos morfológicos de neoformações de linfonodos ativados, no nosso caso, pela presença de neoplasia regional.

Assim pretendemos nesse trabalho apresentar a nossa interpretação de que alguns aspectos de neoformação de tecido linfático tão pouco lembrados, são erroneamente interpretados como processo degenerativo "adiposo" do parênquima do linfonodo.

II. MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS

O nosso material de estudo constituiu-se no exame de milhares de linfonodos extirpados cirurgicamente das axilas, da região cervical, do mesentério e de outras localizações de pacientes portadores de carcinomas das mamas, da rinofaringe, boca, estômago e intestino.

Os gânglios linfáticos sempre foram incluídos rotineiramente em parafina e corados pela Hematoxina e Eosina.

Nos linfonodos axilares e intra-abdominais dos dois aspectos citados foi mais freqüente o achado da "atrofia adiposa" onde o parênquima do linfonodo apresenta-se com a forma de uma meia-lua envolvendo nódulo de tecido adiposo e assim é incluído para exame. Na região cervical foi mais freqüente o encontro de linfonodos menores com tecido adiposo presente misturado ao parênquima por vezes envolto por cápsula fibrosa.

Um terceiro aspecto encontrado, mas que geralmente não é citado como atrofia adiposa, por ser muito fácil de verificar-se, constituir verdadeira neoformação de linfonodos, são as pequenas coleções de tecido linfóide, por vezes contendo centros germinativos, sem cápsula ou somente com esboços dela.

Os tratados usuais de Patologia, desde os mais tradicionais como o de L. Aschoff (1), até os mais recentes como o de Robbins (5) no capítulo dos linfonodos ao tratarem dos seus aspectos degenerativos incluem a atrofia adiposa como o mais freqüente e com aspectos anatomopatológicos que descrevemos em primeiro lugar.

Assim, H. Schridde (in Aschoff) (1) relata: "o mesmo que sucede a outros órgãos, nos gânglios linfáticos se observa na velhice o desaparecimento do parênquima. O tecido linfóide é substituído por tecido conjuntivo ou por tecido adiposo, sobretudo nos linfonodos mesentérios ou região inguinal. O tecido adiposo penetra pouco a pouco a partir do hilo. Se o tecido adiposo aparece de modo patológico, cabe admitir a lipomatose dos gânglios linfáticos. Às vezes se encontram restos escassos de tecido linfático do córtex, que quase sempre está esclerosado em maior ou menor grau" C. Sternberg (6) também participa da mesma opinião e sua descrição, do aspecto morfológico feita mesmo antes de H. Schridde, com ela coincide. Herman e Morel (3), Ribbert e Hamperl (4), Bogliolo (2), interpretam da mesma forma esse aspecto dos linfonodos. De modo geral os demais autores repetem essas afirmações.

Como vimos, interpretam os diversos autores, esses aspectos macroscópicos e histopatológicos como sendo decorrentes da atrofia do parênquima linfático que ocorreria com a idade e sua conseqüente substituição pelo tecido adiposo a partir do hilo. O aspecto mais característico descrito é o do tecido linfóide constituir-se em faixa em forma de crescente ou aspecto de meia-lua, e envolvendo tecido adiposo correspondente. Por vezes até, formam esse conjunto aspecto pseudotumoral, ensejando sua exerese cirúrgica, com diagnóstico clínico de lipoma como já observamos (microfoto 2).

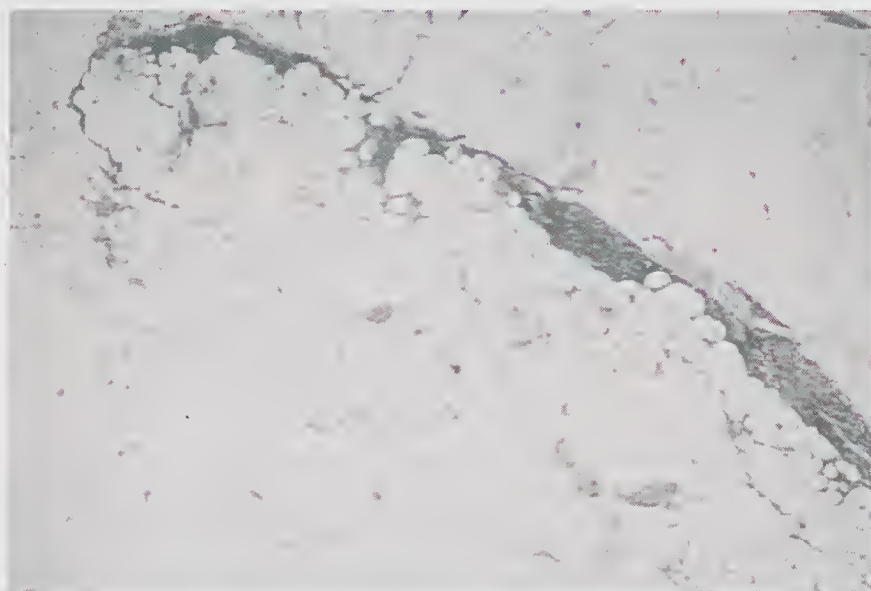
Outro aspecto microscópico não analisado convenientemente, é o encontro de linfonodo ovalar com o parênquima envolto por cápsula fibrosa bem constituída. Ao lado do parênquima linfóide envolvido pela cápsula é observado áreas com presença de tecido adiposo (microfoto 3).

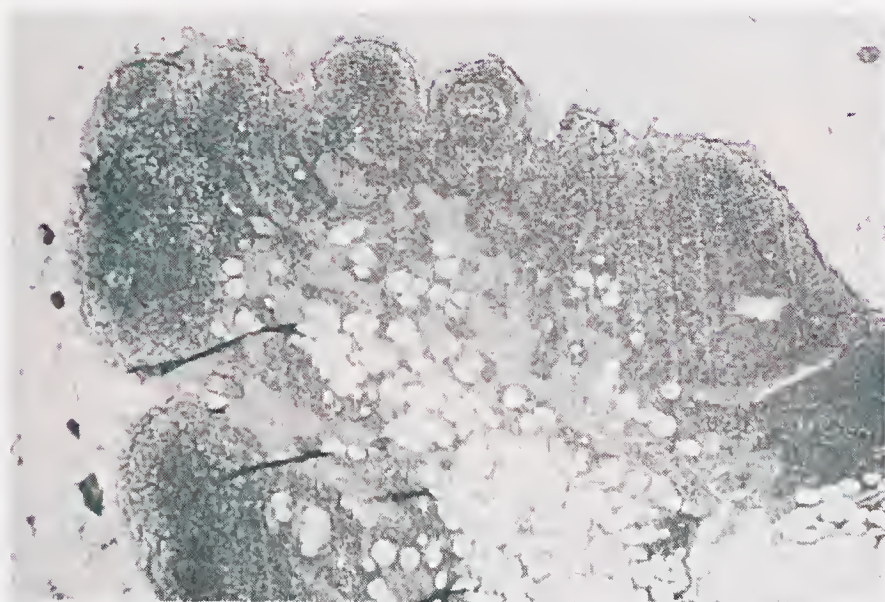
III — CONCLUSÕES

Analisemos os vários aspectos. No primeiro caso, o termo degeneração a nosso ver não é bem aplicado. Tratar-se-ia, se fosse o caso, de simples atrofia senil com substituição do parênquima linfóide pelo tecido adiposo, como ocorre no miocardio na chamada "adipositas cordis" ou ainda na hiperplasia ex-vácuo do tecido adiposo da pelvis renal por hipotrofia do parênquima do rim. Não seria verdadeiramente processo degenerativo, mas simplesmente processo substitutivo. A degeneração adiposa seria verdadeira no caso do linfonodo se a assim chamada "degeneração gordurosa" ocorresse no parênquima linfóide. Se existisse, verdadeira cápsula em derredor, envolvendo tanto o parênquima linfóide como o tecido adiposo seria, talvez, um testemunho da atrofia e sua substituição. Mas, neste caso o que se observa é uma coleção de tecido linfóide com a forma assinalada, na maior parte das vezes sem cápsula do lado adiposo estando o tecido linfóide simplesmente imerso na massa adiposa (microfoto 1 e 2).

Este aspecto, a nosso ver, é mais característico da neoformação de linfonodos, a partir do subendotélio dos linfáticos como é descrito na literatura (6). O tecido linfóide assim neoformado iria desenvolvendo-se até atingir sua forma ideal sendo posteriormente envolvido pela cápsula fibrosa, completando a sua neoformação.

Portanto o aspecto característico no qual o linfonodo fica constituído por uma fina camada de parênquima em forma de meia-lua, envolvendo tecido adiposo, na nossa opinião, nada mais é do que um aspecto da neoformação de linfonodos pela ação antigênica, e não constitui assim verdadeiramente uma "atrofia adiposa".

Já no segundo aspecto descrito com a cápsula formada e o encontro conjunto de tecido linfóide e adiposo por ela contidos (microfoto 3) pode comportar a nosso ver duas explicações: a primeira seria a de realmente se tratar de uma atrofia com lipomatose substitutiva. A outra seria a de uma neoformação linfonodal ainda incompleta, no sentido parenquimatoso, mas com a cápsula já totalmente desenvolvida. Acreditamos, também nesse caso, na segunda hipótese, desde que a excitação antigênica nos fala mais no sentido de uma neoformação do que no de uma degeneração.

Microfoto 1: Linfonodo, HE. Aspectos da assim chamada "degeneração gordurosa". Linfonodo axilar, onde o parênquima é constituído em uma simples meia-lua envolvendo tecido adiposo.

Microfoto 2: Linfonodo HE. Aspecto de linfonodo inguinal onde se nota, a nosso ver, neoformação de tecido linfóide. Há esboços de cápsula e vaso maior sugerindo aspecto hilar.

Microfoto 3: Linfonodo HE. Aspecto de linfonodo notando-se na medular presença maior de tecido adiposo. Algumas células adiposas ainda são vistas inclusas, no parênquima.

Finalizando, reafirmamos que a nosso ver, o aspecto tradicionalmente, descrito como sendo o de uma degeneração adiposa dos linfonodos trata-se na realidade de aspectos sugestivos da neoformação linfonodal em decorrência de estímulos antigênicos.

ABSTRACT: The authors presents interpretation for the histological aspects of the so called "adipous degeneration" of the lymphnode. They conclued that this aspect almost realy means a neoformation of lymphnode and not a degenerative process.

KEYWORDS: Degenerations. Lymphonodes. Lymphoadenopathies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASCHOFF, L. *Tratado de Anatomia Patológica*. Barcelona, Editorial Labor S.A., 1934. Tomo I.
2. BOGLIOLO, L. *Patologia*. 2.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.
3. HERRMANN, G. & MOREL, CH. *Précis d'Anatomie Pathologique*. Paris, Octave Doris Ed., 1914.
4. RIBBERT, H. & HAMPERL, H. *Tratado de Patologia Geral e Anatomia Patológica*. Editorial Labor S.A., 1959.
5. ROBBINS, S.L. *Patologia*. 2.ª ed. bras. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969.
6. STERNBERG, C. *Handbuch der Spezziellen Pathologischen anatomie und histologie*. Berlin, Springer-Verlag, 1926. vol. I, 1.

Mem. Inst. Butantan
44/45:133-152, 1980/81

FINDINGS OF PATHOLOGICAL ANATOMY IN MAMMALS FROM THE "FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO" 1971

Helio Emerson BELLUOMINI *
Lilian de Stefani Munaó DINIZ **
Adayr Mafuz SALIBA ***

ABSTRACT: In 1971, from a total of 2066 animals of the ZOO, 674 of which Mammals, 101 were received for post mortem examination. Forty seven cases were selected from the total of animals that were examined, comprising 27 acclimatized animals and 20 under quarentine. Tissue fragments were collected and fixed in a neutral 15% formaldehyde solution, or in Bouin's fluid. Paraffin tissue sections, 5 μ in size, were submitted to staining methods for histological examination. Material collected concerned the following orders: Primates, Carnivora, Artiodactyla, Perissodactyla, Marsupialia, Rodentia and Edentata. Among the examined animals, the highest incidence of alterations was seen at the level of the circulatory tract. Following, were disturbances of the digestive tract, respiratory and urinary tract. At times, alterations of the genital tract and some cases of traumatism, were observed. A fact to be noted is the finding of neoplasia represented by one case of renal adenocarcinoma.

KEYWORDS: Capitivity animals, Pathology.

INTRODUCTION

Practical experience concerning animals maintained in captivity at are assembled in the papers pf T-W-Fiennes (1966, 1966 and 1968), who studied main diseases that took place in Regent's Park, London; Hime (1976), and Keymer (1976) with similar studies at the same Zoo.

Practical experience concerning animals maintained in captivity at the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" (ZOO) is reported in the publications of Matera et al. (1968), who described five cases of infection caused by *Dioctophyma renale* in *Chrysocyon brachyurus*, Saliba et al.

* Technical Director of the "Serviço de Animais Peçonhentos", Instituto Butantan, São Paulo.
** In Charge of the Veterinary Division of the Fundação Parque Zoológico de São Paulo.
*** Professor in charge of the Pathology and Clinic Department of the Veterinary and Zootechnical School of the University of São Paulo.
Address: INSTITUTO BUTANTAN Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil

(1968), who described a case of sporotrichosis in a chimpanzee, Matera et al. (1967) with the description of three cases of rabies in *Pteronura brasiliensis*, Simon et al. (1975), who reported a case of infection by *Yersinia* spp. in *Callicebus moloch hoffmansi*, and Costallat, L.F. et al. (1978) with two cases of mycobacteriosis in monkeys.

In 1971 from a total of 2066 animals of the Zoo, 674 of which Mammals, 101 were received for post mortem examination. The following is an account of the more interesting cases, comprising 27 acclimatized animals, and 20 under quarantine.

MATERIAL AND METHODS

Material of the following animal orders, families, genera and species was collected.

	Order, Family	Species
1.	Marsupialia, Phalangeridae	*Tricosurus vulpecula*
	Didelphidae	*Marmosa murina*
	Macropodidae	*Thylogale stigmatica*
2.	Endentata, Myrmecophagidae	*Tamandua tetradactyla*
		Myrmecophaga tridactyla
3.	Rodentia, Chinchillidae	*Chinchilla laniger*
	Capromidae	*Myocastor coypus*
4.	Perissodactyla, Tapiridae	*Tapirus terrestris*
	Rhinocerontidae	*Diceros bicornis*
5.	Artiodactyla, Cervidae	*Mazama simplicicornis*
		Ozotocerus bezoarticus
		Blastocerus dichotomus
	Tayassuidae	*Tayassu tajacu*
	Bovidae	*Bubalus bubalis*
		Ovis aries
		Ovis musimom
		Antilope cervicapra
6.	Carnívora, Felidae	*Felis yaguaroundi*
	Procyonidae	*Procyon lotor*
	Canidae	*Chrysocyon brachyurus*
	Mustelidae	*Pteronura brasiliensis*
	Otariidae	*Zolophus californianus*
7.	Primata, Callithricidae	*Callithrix penicillata*
		Callithrix spp.
		Saguinus niger
		Saguinus bicolor
	Cebidae	*Cacajao melanocephalus*
		Alouatta guariba
		Saimiri sciureus

BELLUOMINI, H. E.; DINIZ, L. S. M. & SALIBA, A. M. — Findings of pathological anatomy in mammals from the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" in 1971. *Mem. Inst. Butantan*: *44/45*:133-152, 1980/81.

Tissue fragments were collected and fixed in a neutral 15% formal dehyde solution, or in Bouin's fluid.

Paraffin tissue sections, 5μ in size, were submitted to the following staining methods for histological examination: Regaud's Ferric Hematoxilin, Congo Red, Perlz's Blue, Wilder Foot, and Mallory's trichromic method.

The ZOO's record number for each specimen, appears in brackets.

RESULTS

1. *Trichosurus vulpecula* (3572)

   Female, unknown age, received from Frankfurt in December, 1971; died one day after arrival at the ZOO.

   Main disease: Cachexia

   Morbid anatomic findings: cachexia

   Histopathological findings: hyaline degeneration of the myocardial fibers; hemosiderosis, and toxic dystrophia of the liver; necrosis and calcification of the renal tubuli.

2. *Marmosa murina* (1931)

   Male, unknown age, captured in the forest of the ZOO, where it remained for two years, never presenting any organic alteration. Main disease: endocarditis, and myocarditis.

   Morbid anatomic findings: endocarditis, and myocarditis.

   Histopathological findings: chronic interstitial myocarditis, hemorrhage; pulmonary edema and congestion; hepatic hemoside rosis; chronic interstitial nephritis.

3. *Chironectes minimus* (3698)

   Male, unknown age, proceeding from the vicinity of the "Guarapiranga Dam" — São Paulo. After 21 days in captivity a lesion on the tail was observed, treatment had no satisfactory results, developing posterior necrosis. The animal died a month and a half later. Main disease: purulent necrotic dermatitis on the tail.

   Histological findings: necrotic purulent dermatitis, hyaline degeneration and calcification of the myocardial fibers; passive congestion, hemorrhage, necrosis and calcification of the smooth muscle fibers of the bladder's wall; necrosis and calcification of the renal tubuli; cardiac liver.

4. *Thylogale stigmatica* (3578)

   Female, unknown age (adult) from Frankfurt. Died after parturition.

   Main disease: ulcerous thrombo-endocarditis of the mitral valve. Morbid anatomic findings: ulcerative-thrombo endocarditis of the mitral valve; passive hepatic congestion; passive congestion of the spleen, passive renal congestion.

Histological findings: chronic interstitial myocarditis, ulcerative thrombo-endocarditis; focal necrosis and chronic hepatic congestion.

5. *Thylogale stigmatica* (3579)

Female, unknown age (adult), proceeding from Frankfurt, stayed at the ZOO for two years without any apparent signs or symptons. Death took place during Winter.

Main disease: purulent pneumonia.

Morbid anatomic findings: purulent pneumonia; cystitis hepatitis and vicarious hypertrophy of the left kidney.

Histopathological findings: purulent pneumonia; chronic interstitial hepatitis; chronic cystitis, necrosis of central follicle of spleen.

6. *Thylogale stigmatica* (3576)

Female (adult) from Frankfurt. Death after parturition.

Main disease: chronic myocarditis, bronchopneumonia.

Morbid anatomic findings: chronic myocarditis, bronchopneumonia.

7. *Thylogale stigmatica* (3577)

Male, unknown age, proceeding from Frankfurt. After 16 days of quarantine, it was found dead.

Main disease: intestinal intussusception.

Morbid anatomic findings: intestinal intussusception.

8. *Tamandua tetradactyla* (3680)

Female, unknown age, proceeding from "Serra do Mar" — São Paulo. It died after 12 days of captivity, showing apathy, slow movements, nasal discharge, T-36°C.

Main disease: hypoproteinemia.

Morbid anatomic findings: pulmonary edema; anasarca; ascitis; hydropericardium.

9. *Myrmecophaga tridactyla* (3742)

Male, unknown age, from Itai-São Paulo.

Parasitological examination: large amount of *Ancylostoma* sp ova. Main disease: verrucous thrombo-endocarditis of the bicuspidal and mitral valves.

Morbid anatomic findings: thrombo-endocarditis of the bicuspidal and mitral valves; peptic ulcer of the stomach and duodenum; passive renal congestion.

Histopathological findings: splenic and adrenal amyloidosis — fig. 1, 2; peptic ulcer of the stomach and duodenum.

10. *Chinchilla laniger* (390)

Male, from the North of Chile, staying for five years at the ZOO.

Main disease: purulent pneumonia.

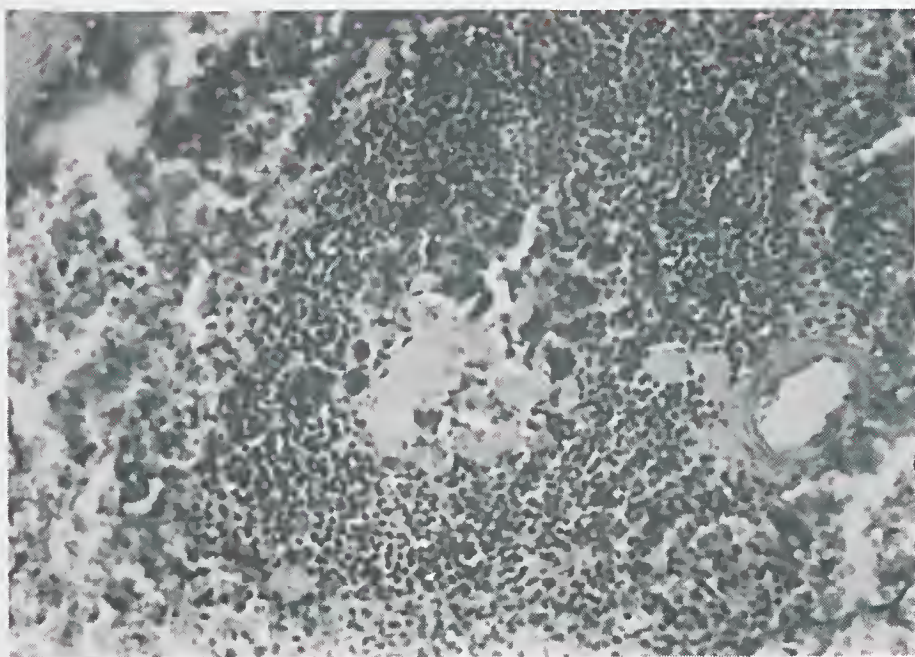



Fig. 1 — Thin section of the spleen of *Myrmecophaga tridactyla* demonstrating amyloid infiltration in the follicles. HE staining; magnification about 160 x.

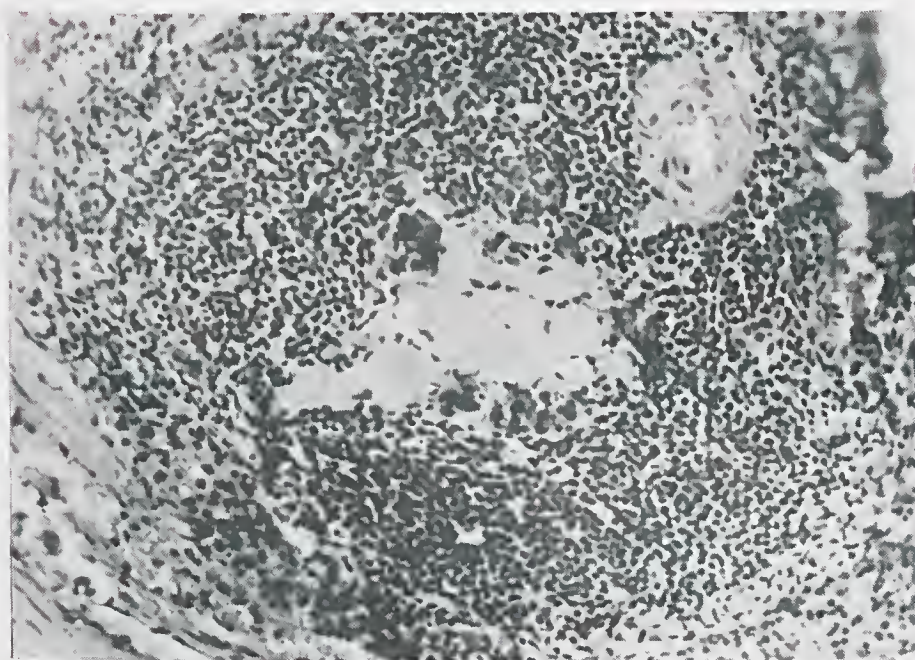



Fig. 2 — Details of fig. 1. HE staining; magnification about 400 x.

Morbid anatomic findings: purulent pneumonia.

Histopathological findings: purulent pneumonia — fig. 3.

11. *Chinchilla laniger* (3671)

Female, lived for several years with its previous owner, before being donated to the ZOO, where it remained for two months.

Main disease: myocarditis and verrucous thrombo-endocarditis of the mitral valve.

Morbid anatomic findings: chronic interstitial myocarditis; chronic pericarditis; verrucous thrombo-endocarditis of the mitral valve. Histopathological findings: chronic interstitial myocarditis; chronic pericarditis; verrucous thrombo-endocarditis; pulmonary edema and emphysema; serous glomerulitis.

12. *Chinchilla laniger* (3674)

Female, lived for many years with its owner, and was then donated to the ZOO, where it stayed for two months.

Main disease: toxic dystrophia of the liver.

Morbid anatomic findings: toxic dystrophia of the liver; gastroenteritis.

Histopathological findings: necrosis and steatosis of the liver; passive congestion and pulmonary hemorrhage; hyaline degeneration of the myocardic fibers; hemorrhagic enteritis.

13. *Chinchilla laniger* (3672)

Male, lived for many years with its previous owner, and was then donated to the ZOO, where it stayed for two months.

Main disease: verrucous thrombo-endocarditis of the mitral valve, and focal myocarditis.

Morbid anatomic findings: chronic myocarditis, and chronic verrucous thrombo-endocarditis.

14. *Myocastor coypus* (2150)

Male, born at the ZOO, two years old. It was found dead in its cage after presenting inappetency and apathy.

Main disease: acute glomerulonephritis; serosas with ecchymosis and suffusions.

Histopathological findings: acute glomerulonephritis — fig. 4.

15. *Myocastor coypus* (3167)

Male, captured in Santo Amaro — São Paulo, estimated age one year. Stayed at the ZOO for one year. It was found dead without prior signs or symptons.

Main disease: pericarditis and chronic fibrinous peritonitis.

Morbid anatomic findings: pericarditis and chronic fibrinous peritonitis.

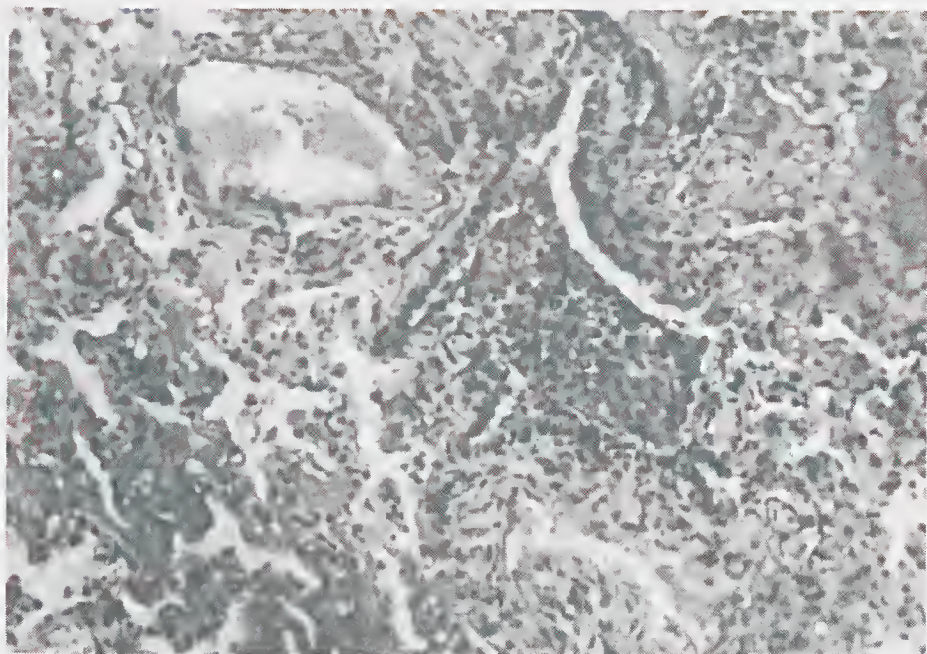



Fig. 3 — Thin lung section of *Chinchilla laninger*, presenting bronchioles and alveoli filled with pus. HE staining; magnification about 160 x.

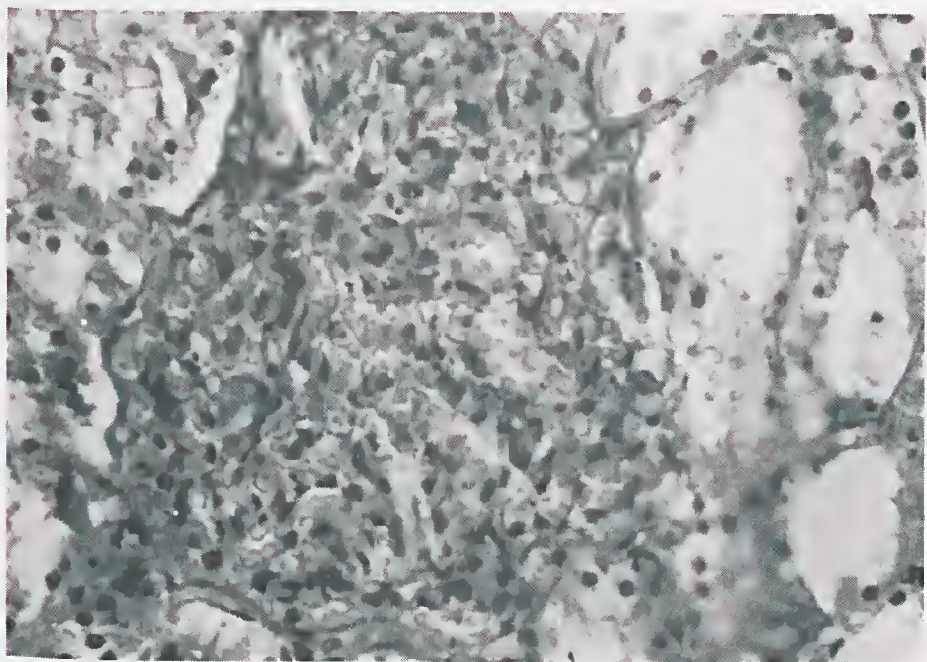



Fig. 4 — Thin kidney section of *Myocastor coypus*, indicating Malpigi's vesicles with glomerulonephritis. HE staining; magnification about 400 x.

16. *Tapirus terrestris* (332)

Female, approximately five years old, received at the ZOO on May 9, 1971 from Goiania, Brazil. On May 15, 1971, parasitologic examination showed ova and larvae of *Strongylus* sp. and the animal was submitted to antihelminthic treatment. On June 16, 1971 it gave birth to a young female. On July 21, 1971 it presented dysentery and was medicated, with no satisfactory results and death took place on August 24, 1971.

Main disease: catarrhal gastroenteritis.

Morbid anatomic findings: catarrhal gastroenteritis.

Note: Within the intestines, a great amount of sand was found.

This incidence caused the removal of this animal species from sandy enclosures.

Histopathological findings: toxic dystrophia of the liver; hyaline and vacuolar degeneration of the myocardic fibers; catarrhal gastroenteritis, glomerular and interstitial renal hemorrhage.

17. *Tapirus terrestris* (3745)

Female, born at the ZOO on June 16, 1971. Presented dysentery on August 2, 1971; intense treatment did not show any improvement.

The animal was sacrified on the 28th of September of the same year, presenting dehydration and cachexia.

Main disease: catarrhal hemorrhagic gastroenteritis.

Morbid anatomic findings: catarrhal hemorrhagic gastroenteritis; toxic dystrophia of the liver.

Histopathological findings: toxic dystrophia of the liver; catarrhal hemorrhagic gastroenteritis.

18. *Diceros bicornis* (642)

Male, received at the ZOO on the 3rd of September, 1971, born in Angola, proceeding from Portugal. Early in the morning of October 20, 1971, the animal presented symptoms of severe colics which probable started early in the morning. The animal was immediately medicated with no satisfactory results, dying soon after.

Main disease: intestinal volvulus (jejunum and ileus).

Morbid anatomic findings: fibrino hemmorhagic peritonitis; intestinal volvulus.

19. *Mazama simpliciconis* (3867)

Female, received on August 29, 1971, presenting diffuse skin injuries, some of them with fistulous foccus. It died on September 3, 1971.

Main disease: chronic interstitial myocarditis, and thrombo-endocarditis of the valves.

Morbid anatomic findings: chronic interstitial myocarditis; cardiac liver; passive congestion, and pulmonary edema; purulent dermatitis.

Histopathological findings: cardiac liver; chronic myocarditis, and chronic endocarditis.

20. *Mazama simplicicornis* (3749)

Female, estimated age several months. Arrived on 19th June 1971, extremely emaciated, inappetent during a couple of days. After medication, and special food, however, died on June 26, 1971, still rejecting food.

Main disease: verminosis.

Morbid anatomic findings: cachexia; secondary anemia; anasarca. *Note*: numerous exemplaries of trichostrongylidae were found in the intestines.

21. *Mazama simplicicornis* (3044)

Female, adult, arrived on July 18, 1970. It gave birth to one young on April 8, 1971 and died on April 23 of the same year.

Main disease: ulceropolypous endocarditis.

Morbid anatomic findings: ulceropolypous endocarditis, pulmonary hemorrhage and hepatic cirrhosis.

Histopathological findings: pigmentary hepatic cirrhosis — fig. 5; chronic perisplenitis; ulceropolypous thrombo-endocarditis.

22. *Ozotocerus bezoarticus* (3889)

Female, unknown age, proceeding from Minas Gerais. Arrived on September 15, 1971, under the effect of a tranquilizer, extremely weak. Died on September 28, 1971.

Main disease: hepatic cirrhosis, ascitis; hydrothorax; hydroperitoneum.

Histopathological findings: biliary cirrhosis.

23. *Ozotocerus bezoarticus* (3879)

Female, estimated age two months, proceeding from Mato Grosso.

Arrived on September 10, 1971, presenting intense dysenteria, still in lactation stage. Medicated, however, died on September 16, 1971. Main disease: verminosis.

Morbid anatomic findings: secondary anemia; ascitis; anasarca.

Note: Numerous exemplaries of trichostrongylidae were observed in the intestines.

24. *Ozotocerus bezoarticus* (588)

Female, adult, arrived on 28th of September 1968. On May 30, 1971, it presented respiratory problems, treatment was initiated, however, it died on July 2, 1971.

BELLUOMINI, H. E.; DINIZ, L. S. M. & SALIBA, A. M. — Findings of pathological anatomy in mammals from the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" in 1971. *Mem. Inst. Butantan: 44/45*:133-152, 1980/81.

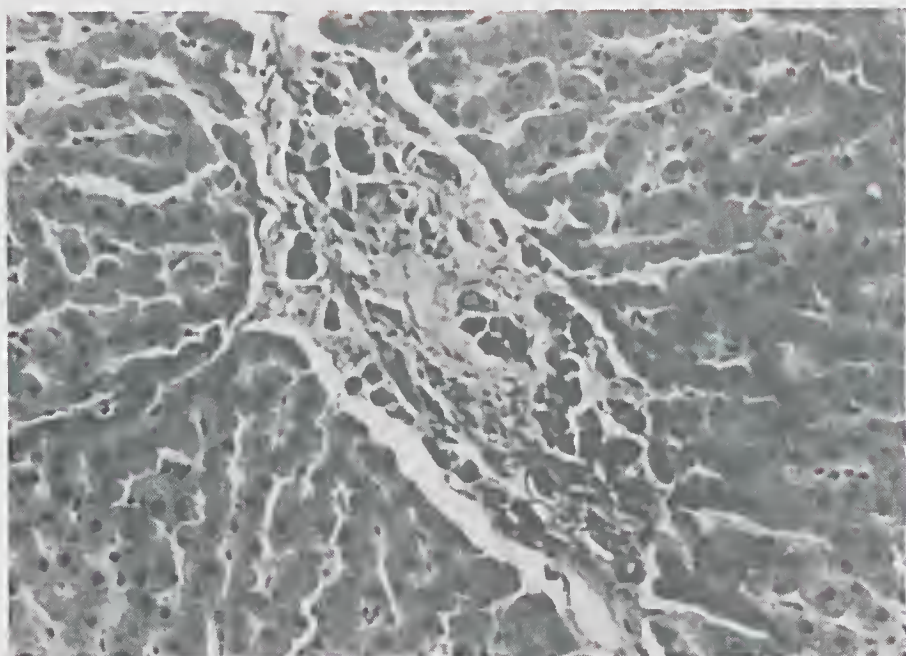



Fig. 5 — Thin liver section of *Mazama simplicicornis*, indicating intense connective proliferation in the portal space, and macrophages congested with hemosiderin. HE staining; magnification about 400 x.

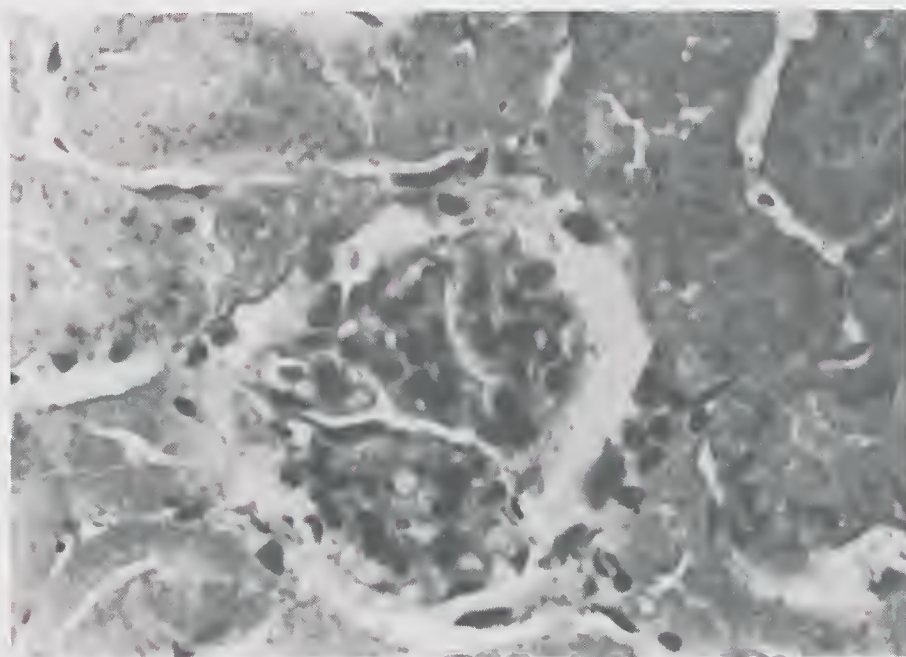



Fig. 6 — Thin kidney section of *Mazama simplicicornis* presenting hemosiderin infiltration in the proximal distorted tubuli. HE staining; magnification about 400 x.

Main disease: purulent bronchopneumonia.

Morbid anatomic findings: purulent fibrinous pleurisy.

Histopathological findings: fibrinous pneumonia. — figs. 7, 8.

25. *Blastocerus dichotomus* (2997)

Female, estimated age two years, arrived on July 8, 1970, from Presidente Epitácio — São Paulo. On October 6, 1971, presented cachexia, dry and bristly fur, anemic mucosa, body temperature 36°C. It died on October 21, 1971.

Main disease: inanition.

Morbid anatomic findings: hydrothorax; ascitis; hydroperitoneum.

26. *Tayassu tajacu* (297)

Male, adult, proceeding from Brasilia on June 21, 1958; it died on October 18, 1971.

Main disease: serofibrinous pericarditis; serous hepatitis; pulmonary edema.

27. *Bubalus bubalis* (190)

Male, six years and eight months old, born at the ZOO on September 9, 1965. Up to May 21, 1971, it showed only small injuries, and endoparasites, when on this date, the animal presented intense apathy, and a brownish urine. Examination of the urine revealed an increased level of glucose and a sediment without erythrocites. On May 26, 1971, in spite of the intense treatment, it died.

Main disease: traumatic pericarditis; hypertrophy of the left and right heart.

Morbid anatomic findings: traumatic pericarditis.

Histopathological findings: fibrinous pericarditis; renal hemosiderosis; hepatic hemosiderosis.

28. *Ovis aries* (2074)

Female, born at the ZOO, five years and six months old. It brought

On May 20, 1971, it suffered traumatism while pregnant.

Main disease: endometritis, and purulent placentitis.

Morbid anatomic findings: endometritis and purulent placentitis.

29. *Ovis aries* (308)

Female, born at the ZOO, five years and six months old. It brought forth one young on June 14, 1969, and on the 24th of February 1971, it presented myasis of the basis of horns, and was medicated. It died on March 14, 1971, without disclosing symptoms.

Main disease: ulceropolypous thrombo-endocarditis.

Morbid anatomic findings: chronic myocarditis and chronic endocarditis; ascitis.

Histopathological findings: chronic myocarditis and endocarditis.

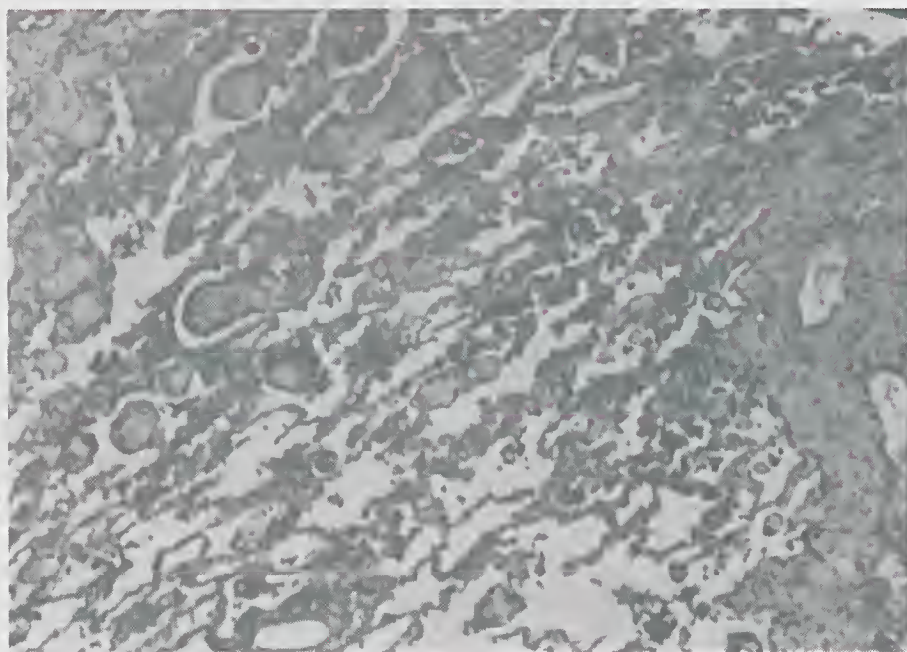



Fig. 7 — Thin lung section of *Ozotocerus bezoarticus* with fibrinous pneumonia, presenting exudative alveoli with carnification. HE staining· magnification about 160 x.

Fig. 8 — Thin lung section with fibrinous pneumonia, showing extense necrotic area, and dystrophic calcification. HE staining; magnification about 400 x.

30. *Ovis musimom* (1444)

Female, born at the ZOO on August 19, 1971, two years and six months old.

Main disease: chronic myocarditis and chronic endocarditis.

Morbid anatomic findings: chronic myocarditis, chronic endocarditis.

Histopathological findings: chronic myocarditis and chronic endocarditis.

31. *Ovis musimom* (3845)

Female, two months and a half old. Born at the ZOO on August 19, 1971. Since it lost its mother, it was bottlefed, and on October 15, 1971, it presented dysenteria.

Parasitological examination: Strongylidae.

Main disease: Helminthic pneumonia.

Morbid anatomic findings: helminthic pneumonia; ascitis; hydrothorax; hydropericardium; secondary anemia; catarrhal hemorrhagic enteritis. Within the intestines, numerous exemplaries of Strongylidae were observed.

32. *Ovis musimom* (411)

Female, four years and three months old. Born at the ZOO on August 12, 1967. On October 15, 1971, it presented dysenteria.

Examination of the faeces revealed numerous ova of Strongylidae.

After medication, however, it died on November 13, 1971.

Main disease: purulent necrotic pneumonia.

Morbid anatomic findings: purulent necrotic pneumonia; ascitis; hydrothorax; hydropericardium; hepatic toxic dystrophia.

33. *Antilope cervicapra* (548)

Male, arrived at the ZOO on January 17, 1963, over 8 years of age.

On August 6, 1971, it suddenly fell down trembling with groaning respiratory sounds, and died 10 minutes after.

Main disease: myocardial infarction.

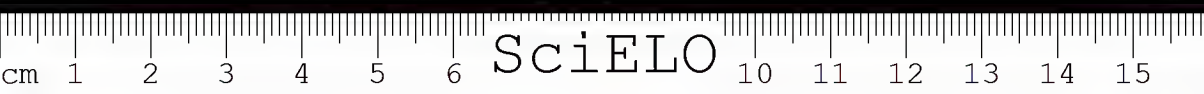
Morbid anatomic findings: myocardial infarction; mesenteric hemorrhage.

Histopathological findings: myocardial infarction; chronic interstitial nephritis; hepatic toxic dystrophia.

34. *Felis yaguaroundi* (3734)

Male, arrived at the ZOO on June 10, 1971. On the 20th of September, 1971, it died after presenting apathy and inappetence.

Main disease: purulent pneumonia.

Morbid anatomic findings: purulent pneumonia.

35. *Procyon lotor* (750)

Male, arrived at the ZOO on the 28th of August, 1964. It became apathic, inappetent on April 25, 1971, and died on the same day.

Main disease: renal neoplasia; gastroenteritis; toxic hepatic dystrophia.

Morbid anatomic findings: renal neoplasia; gastroenteritis; toxic hepatic dystrophia.

Histopathological findings: renal adenocarcinoma — fig. 9, 10, 11; Hemorrhagic catarrhal gastroenteritis; toxic hepatic dystrophia.

Renal metaplastic ossification — fig. 12, 13.

36. *Chrysocyon brachiurus* (3820)

Male, five months old, arrived at the ZOO on August 9, 1971, in an advanced state of cachexia. On August 9, of the same year, it presented bloody faeces, and died on August 11, 1971.

Main disease: cachexia.

Morbid anatomic findings: ascitis; hemopericardium; rachitism. Histopathological findings: necrosis of the central lobe of the liver; necrotic nephrosis; pulmonary edema and hemorrhage.

37. *Pteronura brasiliensis* (196)

Female, 10 years old, arrived at the ZOO on October 28, 1964, from Aquidauana — Mato Grosso. During its stay in the ZOO, presented only injuries by fighting. On May 22, 1971, it rejected food, did not swim, and on May 23, of the same year, it died.

Main disease: calculous pyelonephritis; fibrinous pericarditis; ulcerous thrombo-endocarditis of the tricuspid and mitral valves; purulent cystitis; hemorrhagic catarrhal gastroenteritis.

Histopathological findings: pyelonephritis; fibrinous pericarditis; ulcerous thrombo-endocarditis; purulent cystitis; catarrhal gastroenteritis.

38. *Zalophus californianus* (2202)

Male, unknown age, arrived at the ZOO on September 10, 1969.

On September, 1969, it presented skin injuries caused by fungi.

On March 17, 1970, it presented bilateral keratitis of the eyes, and on April 4, 1970, a cutaneous abcess was observed. It received constant treatment for keratitis and skin lesions up to February 25, 1971. On March 23, 1971, it became inappetent and died on June 21, 1971.

Main disease: internal hemorrhage by rupture of a vessel of the heart basis.

Morbid anatomic findings: internal hemorrhage.

Histopathological findings: chronic myocarditis; interstitial nephritis.

BELLUOMINI, H. E.; DINIZ, L. S. M. & SALIBA, A. M. — Findings of pathological anatomy in mammals from the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" in 1971. *Mem. Inst. Butantan:* *44/45*:133-152, 1980/81.

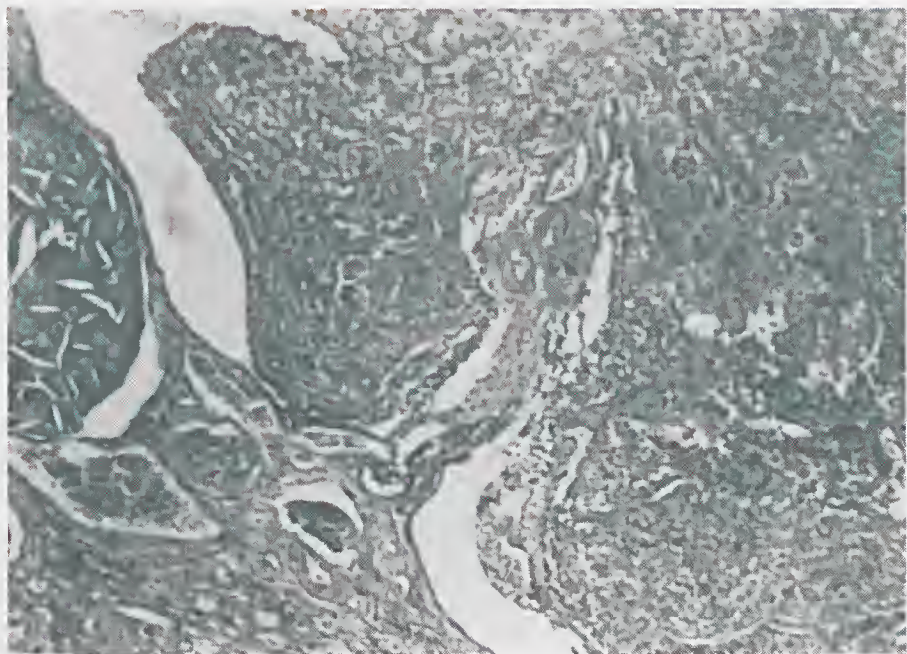



Fig. 9 — Thin kidney section of *Procyon lotor* presenting renal adenocarcinoma. HE staining; magnification about 160 x.

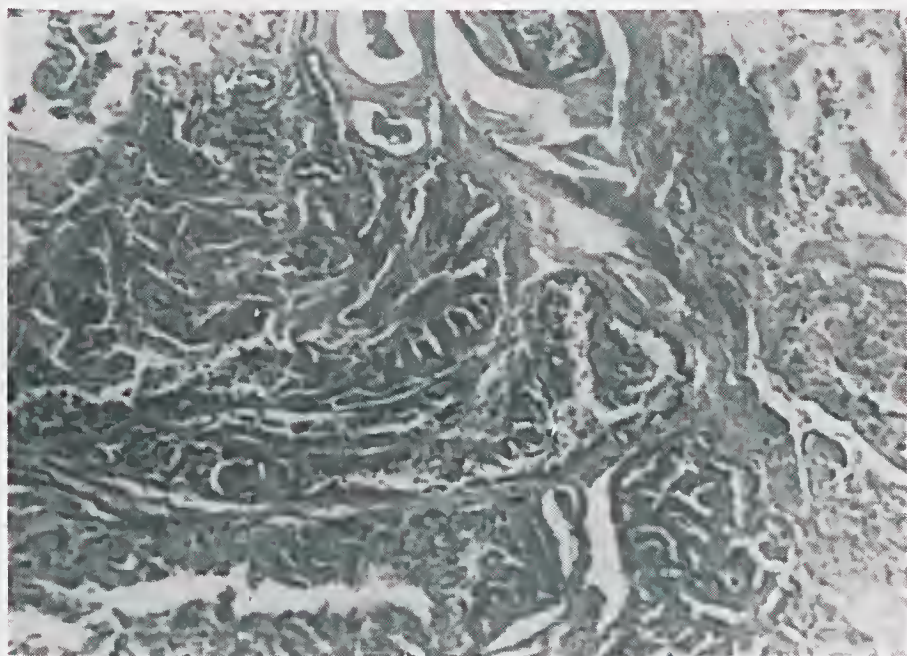



Fig. 10 — Details of fig. 9 showing papilar structures of the neoplasm. HE staining; magnification about 250 x.

BELLUOMINI, H. E.; DINIZ, L. S. M. & SALIBA, A. M. — Findings of pathological anatomy in mammals from the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" in 1971. *Mem. Inst. Butantan:* *44/45*:133-152, 1980/81.

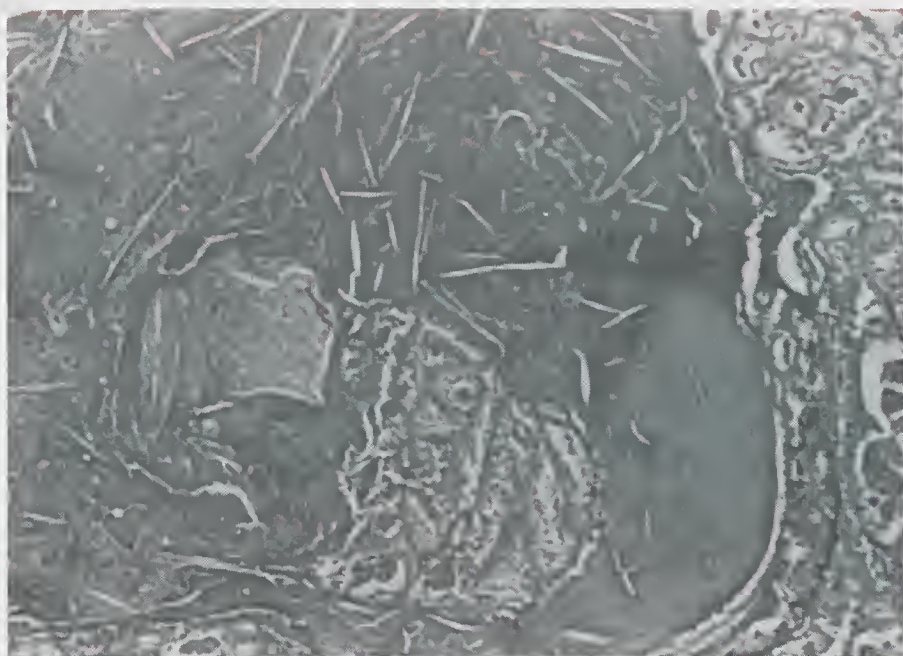



Fig. 11 — Thin kidney sections of *Procyon lotor* showing renal adenocarcinoma with an extense necrotic area were numerous cholesterol crystals are seen. HE staining; magnification about 400 x.

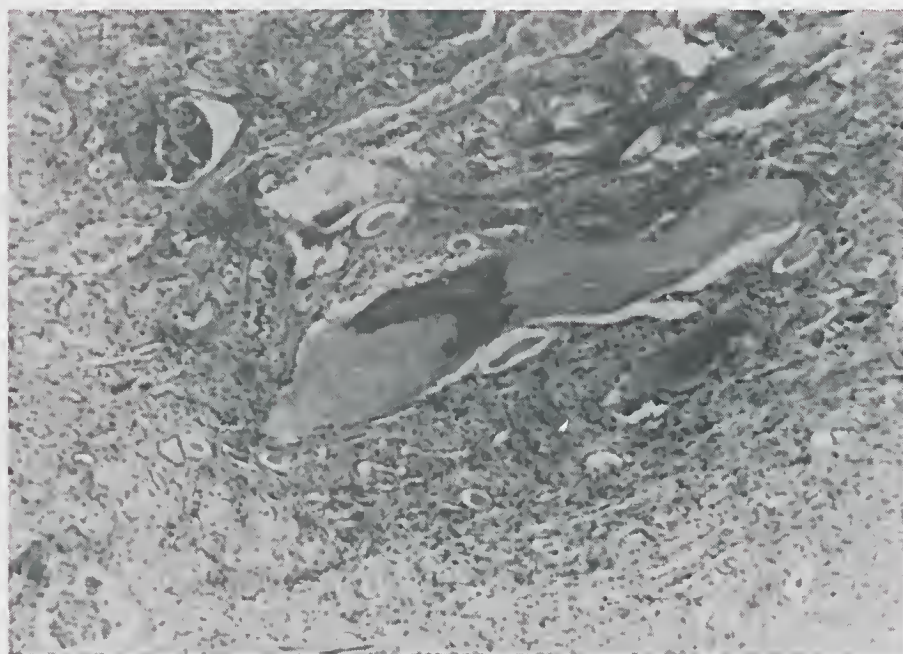



Fig. 12 — Thin kidney section of *Procyon lotor*, showing areas of calcifications and metaplastic ossification. HE staining; magnification about 160 x.

39. *Callithrix penicillata* (3926)

    Female, unknown age, donated on October 2, 1971; it died on October 5, 1971.

    Main disease: verminosis.

    Morbid anatomic findings: secondary anemia; hemorrhagic catarrhal gastroenteritis; cachexia.

    Note: within the intestines numerous exemplaries of strongylidae were found.

40. *Callithrix penicillata* (2878)

    Male, unknown age, donated on March 22, 1970. On November 1, 1970, presented small injuries.

    Main disease: traumatism.

    Morbid anatomic findings: anemia, hemothorax; hemoperitonium; traumatic rupture of the lung and of liver.

41. *Callithrix* spp. (2265)

    Female, unknown age, proceeding from Bahia, on October 8, 1969, and released after quarantine on November 18, 1969. On June 19, 1971, it was found dead without presenting any prior signs or symptoms.

    Main disease: purulent pneumonia.

    Morbid anatomic findings: purulent pneumonia.

42. *Saguinus niger* (3516)

    Male, unknown age, arrived at the ZOO on March 19, 1971, from Goiania. On March 23, 1971, it was found dead.

    Main disease: fibrinous peritonitis.

    Note: in the abdominal cavity, numerous exemplaries of filaria were found.

43. *Saguinus bicolor* (665)

    Female, over four years of age. Arrived from Manaus on September 27, 1967. On March 3, 1971, it presented prolapse of the rectum due to dysenteria. Although rich and varied food was supplied, it gradually became emaciated. It died on September 17, 1971.

    Main disease: pyelonephritis.

    Morbid anatomic finding: pyelonephritis.

    Histopathological findings: pyelonephritis; toxic hepatic dystrophia — fig. 14.

44. *Cacajao melanocephalus* (557)

    Female, approximately eight years of age.

    Main disease: hepatitis.

BELLUOMINI, H. E.; DINIZ, L. S. M. & SALIBA, A. M. — Findings of pathological anatomy in mammals from the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" in 1971. *Mem. Inst. Butantan*: *44/45*:133-152, 1980/81.

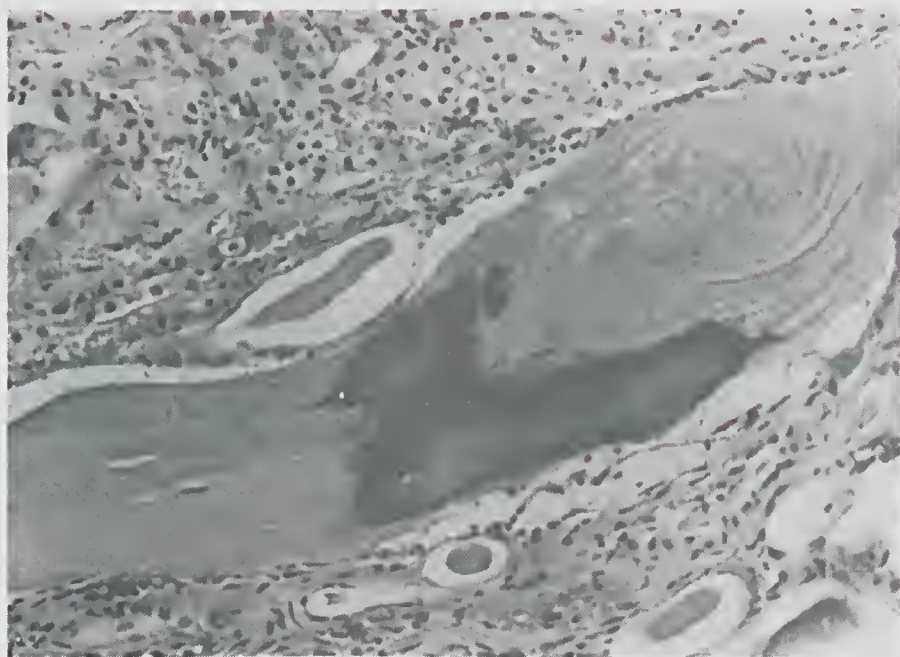



Fig. 13 — Detail of fig. 12 showing hyaline cylinders too. HE staining; magnification about 400 x.

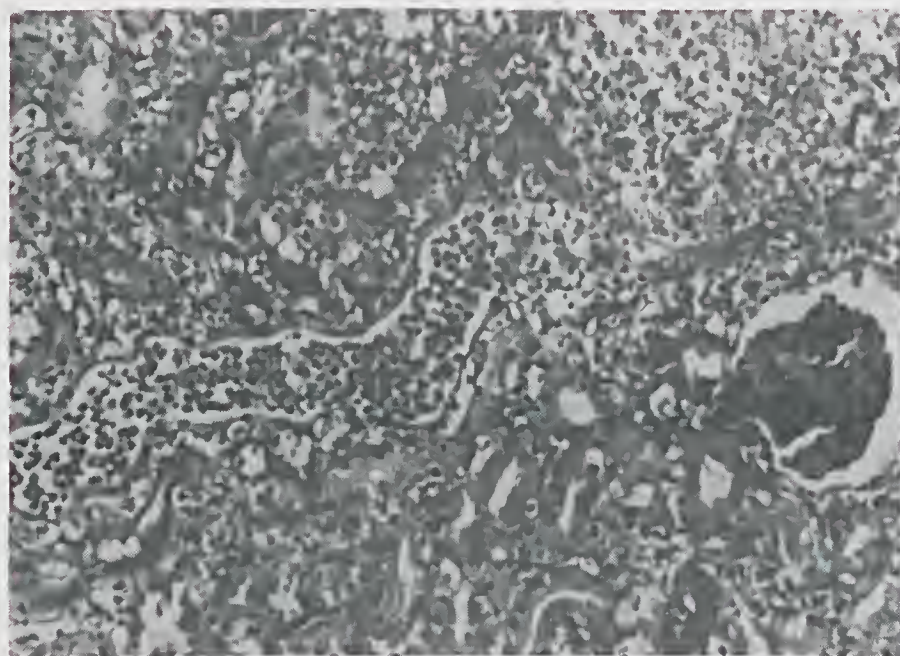



Fig. 14 — Thin kidney section of *Saguinus bicolor* with pyelonephritis. HE staining; magnification about 250 x.

Morbid anatomic findings: hepatitis; pulmonary edema; hydrotorax; interstitial nephritis.

Histopathological findings: edema and passive pulmonary congestion; hepatitis; chronic interstitial nephritis; cardiac hemorrhage.

45. *Alouatta guariba* (3405)

Male, estimated age three years. It was captured when young, arrived on January 28, 1971, from Pariquera-Açu, two years old. On March 4, 1971, it presented ascariasis. On July 15, 1971, it became apathic, inappetent, presented pneumonia and was still infested by ascarides.

Main disease: purulent necrotic pneumonia.

Morbid anatomic findings: purulent necrotic pneumonia; purulent necrotic enteritis; hemorrhagic enteritis.

Histopathological findings: purulent pneumonia; purulent necrotic glossitis; purulent nephritis; splenic lymphoreticular hyperplasia.

46. *Alouatta* sp (3565)

Male, aproximate age 11 months. Arrived on March 28, 1971, from Itapecerica da Serra — São Paulo. On November 15, 1971, it became apathic, inappetent, and showed fetid faeces.

Main disease: hemorrhagic catarrhal gastroenteritis.

Morbid anatomic findings: hemorrhagic catarrhal gastroenteritis; generalized ganglionic hypertrophy; toxic dystrophia of the liver.

Histopathological findings: toxic dystrophia of the liver; ganglionic lymphoreticular hyperplasia.

47. *Saimiri sciureus* (2556)

Male, unknown age. Arrived on June 2, 1970, and on May 13, 1971, presented deep injuries by fighting. It died on May 14, 1971.

Main disease: traumatism.

Morbid anatomic findings: hemothorax; hemoperitonium; hemopericardium; pulmonary traumatism; anemia.

FINAL CONSIDERATIONS

Among the examined animals, the highest incidence of alterations was seen at the level of the circulatory tract, and the most common conditions affecting the animals were thrombo-endocarditis, and myocarditis with their manifestations. Following, were disturbancies of the digestive tract, most part represented by severe patho-anatomical aspects of gatroenteritis, several cases caused by helminths, inducing invariably diarrhea, dehydration, and cachexia in the infested animals. At times, alterations of the urinary tract were observed represented by pyelonephritis, mostly of ascendent origin. A fact to be noted is the finding of neoplasia represented by one case of renal adenocarcinoma.

BELLUOMINI, H. E.; DINIZ, L. S. M. & SALIBA, A. M. — Findings of pathological anatomy in mammals from the "Fundação Parque Zoológico de São Paulo" in 1971. *Mem. Inst. Butantan*: *44/45*:133-152, 1980/81.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank Mrs. Sibylle Heller for her editorial aid and translation.

RESUMO: Durante o ano de 1971, o Zoológico de São Paulo manteve em cativeiro 2066 animais dos quais 674 mamíferos. Foram recebidos 101 mamíferos para exame necroscópico e 47 casos foram selecionados, compreendendo 27 animais aclimatados e 20 em quarentena. Fragmentos de tecidos foram coletados e fixados em solução de formol a 15% ou em líquido de Bouin. Cortes de tecidos de 5 μ foram submetidos a diversos métodos de coloração para exame histológico. O material coletado compreende às seguintes ordens zoológicas: Primates, Carnívora, Artiodactyla, Perissodactyla, Marsupialia, Rodentia e Edentata. Dentre os mamíferos examinados, foi visto maior incidência ao nível do aparelho circulatório. Seguindo, distúrbios do aparelho digestivo, respiratório e urinário. Foram observados também alterações do aparelho genital e alguns casos de traumatismos. Fato a ser notado é o encontro de neoplasia, representada por um caso de adenocarcinoma renal.

PALAVRAS-CHAVE: Animais em cativeiro, Patologia.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

COSTALLAT, L.F.; CASTRO, A.F.P.; SIMON, F.; DINNIZ, L. de S.M. & GIORGI W. Mycobacteriosis in monkeys, a report of two cases.VM/SAC *73:* 651-655, 1978.

HIME, J.M. (1976): report of the Veterinary Officer, Regent's Park, 1974 and 1975. Zool. Soc. London, 1973-1975, pp. 447-455.

KEYMER, I.F. (1976) : Report of the Pathologist, 1973 and 1974. Zool. Soc. London, 1973-1975, pp. 456-493.

MATERA, E.A.; KERBAUEY, V.E.C.J.; MACHADO FILHO, J. DOS S.; MACHADO C.G.; ARRUDA, P.A. & AGUIAR, D.A.A. Sobre a ocorrência de três casos de raiva em ariranha. *Rev. Med. Vet.*, *2*(3):187-195, 1967.

MATERA, E.A.; SALIBA, A.M. & MATERA A. The occurrence of dioctophymiasis in the maned wolf *Chrysocyon brachyurus Int. Zoo.Yb.*, *8:*24-27, 1968.

SALIBA, A.M.; MATERA; MATERA, E.A. & MORENO, G. Sprotrichosis in a chimpanzee. *Mod. Vet. Prac.*, *47:*74, 1968.

SIMON, F.; GIORGI, W., MOLLARET, H.H. & MATERA, E.A. Über eine Yersinia Enterocolitica-Infektion bei einem Springâffchen *(Callicebus moloch hoffmansi)* In: Verhandlungsbericht Internat. Symp. Erkrankungen Zootiere, Tunis, *17:*303-305, Berlin, Akademie Verlag, 1975.

T-W-FIENNES, R.N. The Zoological Society of London. Report of the Society's Pathologist for the year 1963. *J. Zool.*, *148:*341-362, 1966.

T-W-FIENNES, R.N. The Zoological Society of London. Report of the Society's Pathologist for the year 1964. *J. Zool.*, *148:*363-380, 1966.

T-W-FIENNES, R.N. The Zoological Society of London. Report of the Society's Pathologist for the year 1965. *J. Zool.*, *154:*173-191, 1968.

Mem. Inst. Butantan
44/45:153-156, 1980/81

SOBRE A POSIÇÃO SISTEMÁTICA DE *TRASYPHOBERUS PARVITARSIS* SIMON, 1903 (ARANEAE, THERAPHOSIDAE) *

Sylvia LUCAS **

RESUMO: O estudo comparativo dos tipos de *Acanthoscurria ferina* Simon, 1892 e de *Trasyphoberus parvitarsis* Simon, 1903 e o exame de material pertencente à Coleção ORTHOGNATHA (ARANEAE) do Instituto Butantan, permitiu estabelecer a sinonímia de *parvitarsis* com *ferina*, devendo prevalecer o nome atual: *Trasyphoberus ferina* (Simon), 1892.

PALAVRAS-CHAVE: *Acanthoscurria ferina* Simon, 1892; *Trasyphoberus parvitarsis* Simon, 1903; Sinonímia.

INTRODUÇÃO

Em 1892 Simon (5,) descreveu a espécie *Acanthoscurria ferina*, baseado num exemplar, macho, procedente de Tefé, Amazonas, Brasil. O mesmo autor, em 1903 (6,) descreveu o gênero monotípico, *Trasyphoberus*, baseado num exemplar, fêmea, também coletado em Tefé, denominando a espécie *parvitarsis*. A descrição do gênero e da espécie é sumária e o autor comparou o gênero com *Phormictopus* Pocock, 1901 e *Theraphosa* Thorell, 1870.

Mello Leitão, em 1923 (1,) elaborou uma chave para distinção dos gêneros do grupo das THERAPHOSEAS e colocou *Trasyphoberus* muito próximo à *Acanthoscurria* Ausserer, 1871. Transcreveu a descrição original de Simon, tanto do gênero como da espécie, citando que "não lhe são conhecidos na natureza".

Em 1945, Schiapelli e Gerschman (2,) descreveram uma fêmea, procedente do Rio Pimenta Bueno, Acre, Brasil, como pertencente à *T. parvitarsis* e Vellard (7,), no mesmo ano fez alguns comentários sobre a biologia desta espécie e aproximou o gênero à *Acanthoscurria*.

Em 1964, Schiapelli e Gerschman (3,) redescreveram o tipo de *Acanthoscurria ferina*, um macho e descreveram o alótipo, fêmea, dese-

---

* Trabalho realizado com o auxílio da FINEP.

** Seção de Artrópodes Peçonhentos, Instituto Butantan.

nhado os receptáculos seminais, caracter considerado de grande importância para a correta identificação da espécie.

Em 1979 (4,), as mesmas autoras, revendo as espécies tipo dos gêneros da subfamília THERAPHOSINAE, elaboraram uma chave para machos e fêmeas, para a distinção dos gêneros, afirmando não terem visto o tipo nem o material pertencente ao gênero *Trasyphoberus*.

MATERIAL E MÉTODO

Os exemplares examinados foram os seguintes:

Acanthoscurria ferina Simon, 1892, holótipo, macho e alótipo fêmea, n.º 1056 da coleção do Museu Nacional de História Natural de Paris, procedente de Tefé, Amazonas, Brasil, fêmea n.º 3109 da coleção ORTHOGNATHA do Instituto Butantan (Col. I.B. — O) procedente de Bôca do Tefé, Amazonas, Brasil, Hoge e Cavalheiro col., 1952. Fêmea n.º 4524 (Col. I.B. — O), procedente do Peru, Menezes col., Fêmea n.º 1857 (Col. I.B. — O), procedente de Manicoré, Amazonas, Brasil, Armirante col., 1972. Três fêmeas n.º 1884 (Col. I.B. — O) procedente de Humaitá, Amazonas, Brasil, Hoge Col., 1972. Fêmea n.º 2275 (Col. I.B. — O), procedente de Jatobal, Pará, Brasil, Gorgonio col., 1975. Fêmea n.º 2659 (col. I.B. — O), procedente de Belém, Pará, Brasil, Fonrobert col., 1979. *Trasyphoberus parvitarsis* Simon, 1903, holótipo fêmea da Coleção do Museu Nacional de História Natural de Paris.

Os exemplares foram estudados comparativamente, dando-se ênfase ao aspecto das espermatecas, consideradas um bom caracter para a identificação da espécie.

RESULTADOS

O exame do tipo de *Trasyphoberus parvitarsis*, uma fêmea em mau estado de conservação, permitiu apenas verificar a existência do aparelho estridulante localizado na face externa do trocanter do palpo e o estudo das espermatecas.

O estudo comparativo dos tipos de *Trasyphoberus parvitarsis* e de *Acanthoscurria ferina*, além dos demais exemplares pertencentes à Coleção de ORTHOGNATHA do Instituto Butantan, permitiu estabelecer a sinonímia de *parvitarsis* com *ferina*, uma vez que apresentaram receptáculos seminais do mesmo tipo e os demais caracteres também concordarem.

CONCLUSÃO

Não discutimos no presente trabalho a validade do gênero *Trasyphoberus* Simon, 1903, pois, eventualmente, o exame de maior quantidade de material permitirá estabelecer caracteres novos para diferenciá-lo de *Acanthoscurria* Ausserer, 1871.

Estabelecemos que a espécie *parvitarsis* é sinônima de *ferina* e que deve prevalecer o nome *Trasyphoberus ferina* (Simon), 1892.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. M. Hubert o empréstimo dos tipos da coleção do Museu Nacional de História Natural de Paris e ao Dr. A. R. Hoge a ajuda prestada na revisão do texto.

DISCUSSÃO

Além da descrição sumária de *Trasyphoberus parvitarsis* Simon, 1903, o autor não comparou o gênero com *Acanthoscurria*, do qual dificilmente se distingue.

Mello Leitão citou como caracter de distinção entre os dois gêneros, além da forma da fóvea torácica, as sigilas, que seriam quase marginais em *Acanthoscurria* e afastadas da margem em *Trasyphobcrus*, este último caracter não mencionado na descrição original de Simon.

Schiapelli e Gerschman afirmaram, em 1979, não conhecer exemplares pertencentes ao gênero *Trasyphoberus*, quando, em 1945, as autoras descreveram um "genótipo", fêmea, pertencente à coleção de aracnídeos do Museu Argentino, sob n.º 839.

Vellard afirmou ser *T. parvitarsis* espécie comum na região média do Gy-Paraná, principalmente perto do Posto Pimenta Bueno e colocou em dúvida a procedência fornecida por Simon, sugerindo que Tefe poderia ser apenas o porto de expedição do material. Aproximou o gênero à *Acanthoscurria* e citou que *Trasyphoberus* distingue-se facilmente pela presença das cerdas estridulantes, quando, na realidade, a localização das cerdas é a mesma nos dois gêneros.

Em 1979, quando Schiapelli e Gerschman elaboraram uma chave para a distinção dos gêneros da subfamília THERAPHOSINAE, as autoras mencionaram os caracteres já empregados por Mello Leitão para a diferenciação dos dois gêneros, citando na chave macho e fêmea, quando é apenas conhecida a fêmea da espécie tipo do gênero *Trasyphobcrus*.

ABSTRACT: The comparative study of the type specimens *Acanthoseurria ferina* Simon, 1892, and *Trasyphoberus parvitarsis* Simon, 1903 as well as the examination of the material pertaining to the ORTHOGNATHA (ARANEAE) collection of the Instituto Butantan, permitted the conclusion of a synonymy between *parvitarsis* and *ferina*, where the actual name *Trasyphoberus ferina* (Simon, 1892) must predominate.

KEYWORDS: *Acanthoseurria ferina* Simon, 1902; *Trasyphoberus* parvitarsis Simon, 1903; Synonymy. Synonymy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MELLO-LEITÃO, C. Theraphosoideas do Brasil. *Rev. Mus. Paul., 13*:1-438, 1923.

2. SCHIAPELLI, R.D. & GERSCHMAN, B.S. in VELLARD, J., SCHIAPELLI, R.D. e GERSCHMAN, B.S. Arañas Sudamericanas collecionadas por el Doctor J. Vellard. I THERAPHOSIDAE nuevas o poco conecidas. Parte Descriptiva. *Acta zool.* Lilloana., *3*:167-194, 1945.

3. SCHIAPELLI, R.D. & GERSCHMAN, B.S. El gênero *Acanthoscurria* Ausserer 1871 (ARANEAE, THERAPHOSIDAE) en la Argentina. *Phisis, 24*(68): 391-417, 1964.

4. SCHIAPELLI, R.D. & GERSCHMAN, B.S. Las arañas de la subfamília THERAPHOSINAE (ARANEAE, THERAPHOSIDAE). *Rev. Mus. Cien. Nat. "Bernardino Rivadavia"* e *Inst. Nac. Invest. Ci. Nat.*, ser. Entomologia., *5*(10):287-300, 1979.

5. SIMON, E. Etudes arachnologiques. 24 mémoire. XXXIX. Descriptions d'especes et de genres nouveaux de la famille des AVICULARIIDAE (suite). *Ann. Soc. ent. Fr., 61*:271-284, 1892.

6. SIMON, E. Histoire Naturelle des Araignées. Paris, Encyclopédie Robert, L. MULLO Ed., 1897/1903. *2*, fasc., *4*:669-1080.

7. VELLARD, J. in VELLARD, J.; SCHIAPELLI, R.D. & GERSCHMAN, B.S. Arañas Sudamericanas collecionadas por el Doctor J. Vellard. I THERAPHOSIDAE nuevas o poco conecidas. Observaciones biologicas. *Acta zool.* Lilloana., *3*:195-213, 1945.

Mem. Inst. Butantan
44/45:157-160, 1980/81

DESCRIÇÃO DE GÊNERO E ESPÉCIE NOVOS DA SUB-FAMÍLIA THERAPHOSINAE (ARANEAE, ORTOGHATHA, THERAPHOSIDAE)*

Sylvia LUCAS **

RESUMO: São descritos gênero e espécie novos da subfamília THERAPHOSINAE Thorell, 1870: *Nhandu corapoensis*, procedentes de Carapó, Mato Grosso do Sul, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: *Nhandu* n. gen.; *Nhandu carapoensis* n. sp.; ARANEAE; ORTHOGNATHA; THERAPHOSIDAE; THERAPHOSINAE.

INTRODUÇÃO

A subfamília *Theraphosinae* Thorell, 1870, caracterizada pela presença de uma escópula na face interna do fêmur IV, compreende, atualmente, dez gêneros, que se distinguem entre si pela presença ou ausência de um aparelho estridulante, pela localização do mesmo, pela extensão das escópulas metatarsais e pelos caracteres sexuais: presença ou ausência de esporões tibiais, aspecto do bulbo copulador e dos receptáculos seminais.

Baseado nos caracteres citados acima, descrevemos um gênero e espécie novos.

MATERIAL

Holótipo, macho Nro. 4611 da coleção de *Orthognatha* do Instituto Butantan (Col. I.B. — O), procedente de Carapó, Mato Grosso do Sul, Brasil, março 81, Souza Dias col.; paratipo, macho Nro. 4661 Col. I.B. — O, da mesma procedência e col. do holótipo; paratipo, fêmea Nro. 4553 Col. I.B. — O, também procedente de Carapó, set. 79, Pellici col.; macho Nro. 4647 Col. I.B. — O, procedente de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, abr. 81, W. W. Koller col.; macho Nro. 4246 Col. I.B. — O, procedente de Nioaque, Mato Grosso do Sul, Brasil, mar. 75,

---

* Trabalho realizado com o auxílio da FINEP.
** Seção de Artrópodes Peçonhentos, Instituto Butantan. Endereço para correspondência: CEP 05504 — Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

C.B.O. Santos col.; macho Nro. 4707 Col. I.B. — O, procedente de Pedro Gomes, Mato Grosso do Sul, Brasil, mar. 82, A. Francisconi col.

DIAGNOSE DO GÊNERO

Sem aparelho estridulante; escópulas dos metatarsos I e II completas, no III ocupando os 4/5 apicais e no IV apenas o terço apical. Sem apófises tibiais, apenas com espinhos apicais, ventrais. Bulbo copulador de êmbolo curto (Figs. 1, 2, 3 e 4) e receptáculos seminais como na Fig. 5.

DESCRIÇÃO DO HOLÓTIPO

Medidas: comprimento total do corpo, com quelíceras: 58 mm, cefalotórax 21 x 20 mm, pernas I 63 mm, II 59 mm, III 58 mm, IV 73 mm. Patela e tíbia I e IV 23 mm, tíbia e metatarso I 26 mm, IV 35 mm.

Cefalotórax, abdômen e fêmures de colorido castanho escuro, quase negro, dorsalmente, apresentando no abdômen e nas pernas a partir das patelas, longos pêlos avermelhados. O colorido ventral é mais claro, sendo o externo mais escuro. Anéis de cor creme nos ápices dos fêmures, patelas, tíbias, metatarsos e tarsos dos palpos e pernas, mais largos nas pernas posteriores.

A fóvea torácica é curta, reta e profunda. Os olhos medianos anteriores são redondos e distam entre si pouco mais de um diâmetro, os olhos laterais anteriores são ovais e distam dos anteriores medianos um diâmetro dos últimos. A primeira fila ocular é fortemente procurva, uma tangente à borda anterior dos olhos medianos toca o bordo posterior dos laterais.

Lábio mais longo do que largo, com duas sigilas logo abaixo da sutura e apresentando numerosas cúspides apicais. Ancas dos palpos também com numerosas cúspides na área basal. Sigilas posteriores ovais, distando da margem pouco menos do que um diâmetro maior. Sem aparelho estridulante. Metatarsos I e II com escópulas completas, III com escópulas ocupando os 4/5 apicais e IV com escópulas no terço apical. Perna I sem esporões tibiais, porém com vários espinhos apicais, ventrais. Fêmures das pernas, principalmente da perna III espessados. Metatarsos I e II com três espinhos ventrais, dois basais e um apical, III e IV com numerosos. Patelas múticas. Tíbias dos palpos com quatro espinhos na face interna. O bulbo apresenta o êmbolo curto e está representado nas Figs. 1, 2, 3 e 4.

DESCRIÇÃO DOS PARATIPOS

Macho: comprimento total do corpo, com quelíceras: 56 mm, cefalotórax 21 x 20 mm, pernas I 64 mm, II 59 mm, III 57 mm e IV 71 mm. Patela e tíbia I e IV 23 mm, tíbias e metatarsos I 26 mm e IV 35 mm.

O exemplar apresenta o mesmo colorido do holótipo e também o mesmo aspecto, havendo apenas uma pequena diferença na espinulação do palpo, com apenas um espinho basal.

LUCAS, S. Descrição de gênero e espécies novos da subfamília Theraphosinae (Araneae, Orthognatha, Theraphosidae). *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:157-160, 1980/81.

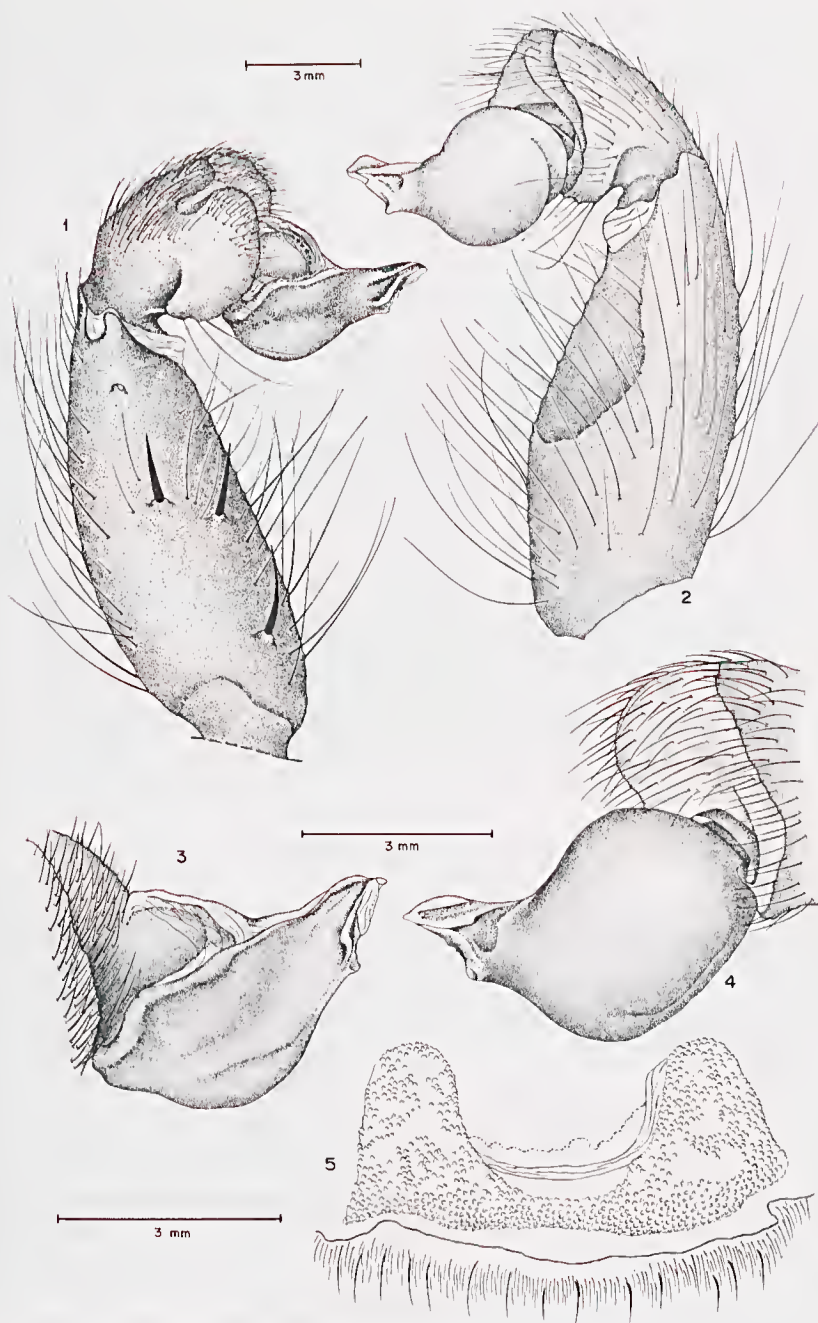



Fig. 1 — *Nhandu carapoensis*, palpo direito, face externa.

Fig. 2 — *Nhandu carapoensis*, palpo direito, face interna.

Fig. 3 — *Nhandu carapoensis*, bulbo direito, face externa.

Fig. 4 — *Nhandu carapoensis*, bulbo direito, face interna.

Fig. 5 — Aspecto dorsal de *Nhandu carapoensis* (exemplar Nro. 4 707 Col. I.B. — O).

Fêmea: comprimento total, com quelíceras: 53 mm, cefalotórax 22,5 x 21 mm, pernas I 55 mm, II 51 mm, III 48 mm e IV 58 mm. Patela e tíbia I 21 mm e IV 22 mm, tíbia e metatarso I 21,5 mm e IV 27 mm.

O colorido é o mesmo do holótipo, ligeiramente mais claro, talvez pela conservação no álcool. Na face dorsal dos fêmures, patelas e tíbias há duas faixas longitudinais glabras, que também aparecem nos machos, porém bem menos nítidas.

DIAGNOSE DIFERENCIAL

Como ocorre nos gêneros *Sericopelma* Ausserer, 1875 (1) e *Theraphosa* Walckenaer, 1805 (4), os machos do novo gênero também não apresentam esporões tibiais. Distingue-se porém de *Sericopelma* pelo aspecto do bulbo e das espermatecas e de *Theraphosa*, além do aspecto do bulbo e espermatecas, também pela ausência de um aparelho estridulante. Aproxima-se de *Pamphobeteus* Pocock, 1901 (2) pelo aspecto do bulbo e espermatecas, porém distingue-se pela ausência de esporões tibiais.

ABSTRACT: a new genus and a new species of the subfamily THERAPHOSINAE are described: *Nhandu carapoensis*, from Carapó, State of Mato Grosso do Sul, Brasil.

KEYWORDS: *Nhandu* n. gen.; *Nhandu carapoensis* n. sp.; ARANEAE; ORTHOGNATHA; THERAPHOSIDAE; THERAPHOSINAE.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Srs. Mauro Cândido de Souza Dias, J. Pellici, Wilson Werner Koller e A. Francisconi o envio dos exemplares que serviram para a realização deste trabalho.

À Sra. Delminda Travassos agradecemos a confecção dos desenhos e ao Dr. A. R. Hoge as fotografias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUSSERER, A. Zweiter Beitrag zur Kenntniss der Arachniden Familie der TERRITELARIEAE (MYGALIDAE — autor). *Verh. zool. bot. Ges. Wien, 25*:125-206, 1875.
2. POCOCK, R.I. Some new and old Genera of S. — American Aviculariidae. *Ann. Mag. Nat. Hist.* (7) *8*:540-555, 1901.
3. THORELL, T. On European Spider. *N. Act. reg. Soc. sci. Upsal.* (3) *7*: 109-142, 1870.
4. WALCKENAER, C.A. Tableau des Aranéides ou Caractères essentiels des tribus, genres, familles et races que renferme le genre ARANEAE de Linné, avec la désignation des espèces comprises dans chacune de ces divisions. Paris: I — XII, 1 — 88, 1 tab., 9 pl., 1805.

Mem. Inst. Butantan
44/45:161-169, 1980/81

ARANHAS DO GÊNERO *CTENUS* COLETADAS NA FOZ DO RIO CULUENE, XINGU, BRASIL: DESCRIÇÃO DE UMA ESPÉCIE NOVA E REDESCRIÇÃO DE *CTENUS VILLASBOASI* MELLO-LEITÃO *(ARANEAE; CTENIDAE)*

Vera Regina D. von EICKSTEDT *

RESUMO: É descrita uma espécie nova de *Ctenus (ARANEAE; CTENIDAE)* baseada numa fêmea coletada na confluência dos rios Culuene e Xingu (Mato Grosso, Brasil) e redescrita dessa mesma localidade-tipo a espécie *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão, 1949. A disponibilidade de novos exemplares desta última espécie, conhecida até agora apenas pelo holótipo, permitiu um melhor conhecimento sobre sua distribuição geográfica e variação intra-específica.

PALAVRAS-CHAVE: Sistemática de aranha; *Ctenus carvalhoi* sp. n.; *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão: redescrição.

INTRODUÇÃO

Em 1949 Mello-Leitão publicou uma relação de sessenta e duas espécies de aranhas coletadas pelo Dr. José Cândido de Mello Carvalho na confluência dos rios Culuene e Xingu (Mato Grosso) das quais dezesseis foram descritas como espécies novas. Quanto à família CTENIDAE, que tem sido objeto de meus estudos, Mello-Leitão mencionou *Ctenus similis* Pickard-Cambridge, 1897 e descreveu uma espécie nova do mesmo gênero, *Ctenus villasboasi*. O estudo do material examinado por Mello-Leitão e de novos espécimes, agora disponíveis, permitiu avaliar a correta posição específica dos exemplares determinados por Mello-Leitão como *Ctenus similis* e um melhor conhecimento sobre a distribuição geográfica e variação intra-específica de *C. villasboasi*, que era conhecida até agora apenas pelo holótipo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados os ctenídeos coletados por Mello Carvalho, pertencentes ao Museu Nacional (Rio de Janeiro), um exemplar de *villasboasi*

* Seção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan. Endereço para correspondência: CEP 05504 — Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

---

do Museu de Zoologia (USP) e cinco da coleção particular de P. Ashmole (Departamento de Zoologia, Universidade de Edinburgh, Inglaterra), que me enviou (abril 1980), para identificação, parte do material por ele capturado durante uma expedição espeleológica nas grutas de Los Tayos, Equador. De *Ctenus carvalhoi* sp. n., além do material-tipo foi examinado um exemplar contido em um lote de *Ctenus* indeterminadas pertencentes ao Muséum d'Histoire Naturelle (Paris). Tive também disponíveis os holótipos de *Ctenus similis* Pickard-Cambridge (British Museum Natural History, Londres) e de *Ctenus villasboasi* (Museu Nacional, Rio de Janeiro).

A descrição das espécies foi baseada no estudo comparativo do colorido, dimensões corporais e caracteres morfológicos externos do material disponível. Na bibliografia precedente a cada uma foram relacionadas as referências à sistemática da espécie constantes na literatura; quando necessário, foram feitas observações a respeito na discussão que acompanha cada espécie. Representou-se graficamente a quetotaxia através de um mapeamento da inserção dos espinhos em cada artículo das pernas e do palpo. A extensão das escópulas ventrais das pernas foi assinalada junto com a espinulação. Para o desenho da genitália feminina utilizou-se uma câmara clara acoplada ao estereomicroscópio. As ilustrações foram feitas pelo autor e passadas a nanquim pela Sra. Delminda Travassos, desenhista do Instituto Butantan.

Abreviaturas usadas: OMA — olhos medianos anteriores; OMP — olhos medianos posteriores; OLA — olhos laterais anteriores; OLP — olhos lateriais posteriores; MNRJ — Museu Nacional (Rio de Janeiro); MZSP — Museu de Zoologia (São Paulo); PAC — coleção P. Ashmole.

Ctenus carvalhoi sp. n.

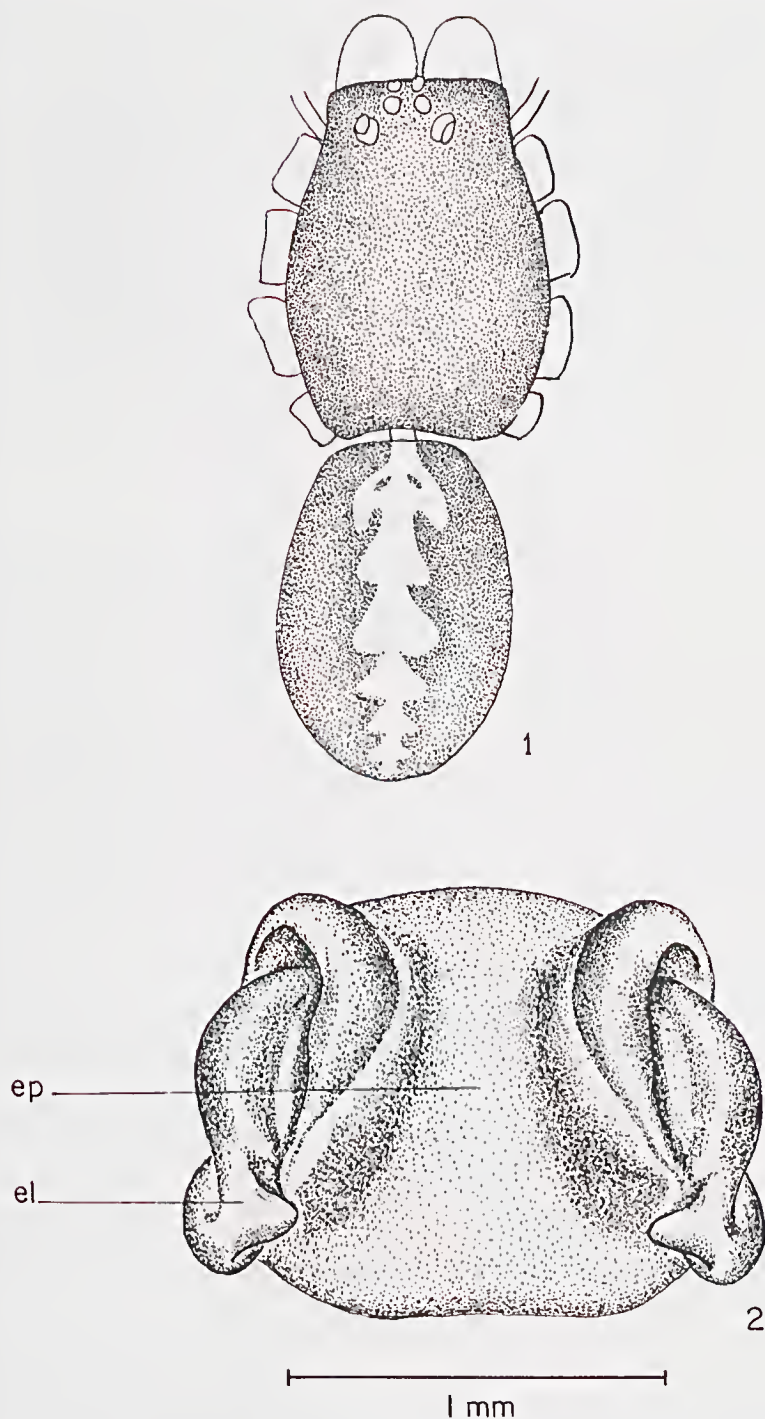
Material-tipo: *Ctenus carvalhoi* é fundamentada nos exemplares determinados por Mello-Leitão (1949) como *Ctenus similis* Pickard-Cambridge, 1897. Holótipo fêmea, J. C. Mello Carvalho col. 1947, confluência dos rios Culuene e Xingu, Mato Grosso, Brasil, n.º 48450MNRJ. Parátipo fêmea jovem, mesmos dados do holótipo.

Etimologia: o nome específico é uma homenagem ao coletor do material-tipo.

Diagnose: *Ctenus carvalhoi* pode ser facilmente distinta das demais espécies conhecidas do gênero pela morfologia do sistema copulador feminino (forma do epígino e escleritos laterais).

Fêmea — Colorido geral castanho escuro. Dorso do abdômen com uma faixa clara longitudinal mediana, de margens serrilhadas (Fig. 1). Ventre marron mais escuro, cortado por linhas longitudinais de pontos brancos, presentes também, esparsamente, na face lateral do abdômen.

Olhos 2-4-2. Quadrângulo ocular mediano tão longo quanto largo, ligeiramente mais estreito na frente. OMA um pouco menores que OMP. OLP e OMP iguais em tamanho. OLA os menores, elípticos. OLA e OLP em um cômoro comum. Segunda fila ocular reta pelas margens anteriores. Distâncias interoculares: OMA distantes entre si e dos OMP cerca de

EICKSTEDT, V. R. D. von. Aranhas do gênero *Ctenus* coletadas na foz do rio Culuene, Xingu, Brasil: descrição de uma espécie nova e redescrição de *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão (Araneae; Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:161-169, 1980/81.

Figs. 1 e 2 — *Ctenus carvalhoi* sp. n. Fig. 1 — padrão do colorido dorsal; Fig. 2 — sistema copulador do holótipo, vista ventral.

um diâmetro; OLA afastados dos OMP e dos OLP pelo seu diâmetro maior. Clípeo igual a um diâmetro dos OMA. Sulco ungueal das quelíceras com três dentes na promargem (o médio, maior) e quatro na retromargem, seguidos de mais um, punctiforme, proximal. Lábio escavado na base, mais longo que largo, atingindo a metade da altura das lâminas maxilares. Escópula rala em toda a extensão da face ventral dos tarsos I a IV e metatarsos I e II e na metade apical do metatarso III (Fig. 7). Artículos dos palpos sem escópula lateral anterior. Quetotaxia das pernas e dos palpos: (Fig. 7). Duas garras tarsais, com dois a três dentes; tufos subungueais densos, verticais. Epígino retangular, com margens laterais abauladas formando um cordão sinuoso (que corresponde à "guide" de Chamberlin (1904) cuja função é orientar o êmbolo em direção aos orifícios de abertura do epígino); escleritos laterais ao epígino (Comstock, 1965: 132) muito desenvolvidos e esclerotizados, entrelaçados com as guias da placa epigineal e terminando em ponta romba na altura do terço basal do epígino (Fig. 2). Pernas IV-I-II-III. Pat. + tib. I > Pat. + tib. IV.

Comprimento do corpo: 19 mm (com quelíceras).

Macho: desconhecido.

Distribuição geográfica: BRASIL: *Amazonas*: São Paulo de Olivença. *Mato Grosso*: confluência dos rios Culuene e Xingu (localidade-tipo).

Material estudado: o material-tipo e uma fêmea, sem dados sobre coletor e data de coleta, São Paulo de Olivença, AM, Brasil, n.º 1877 (tubo 8613) MNHN (Paris).

Discussão: o confronto dos exemplares determinados por Mello-Leitão como *Ctenus similis* Pickard-Cambridge com o holótipo desta espécie demonstrou que eles não são co-específicos (a redescrição de *similis* encontra-se no prelo). Eles também não correspondem a nenhuma das espécies conhecidas do gênero cujos tipos tive oportunidade de estudar.

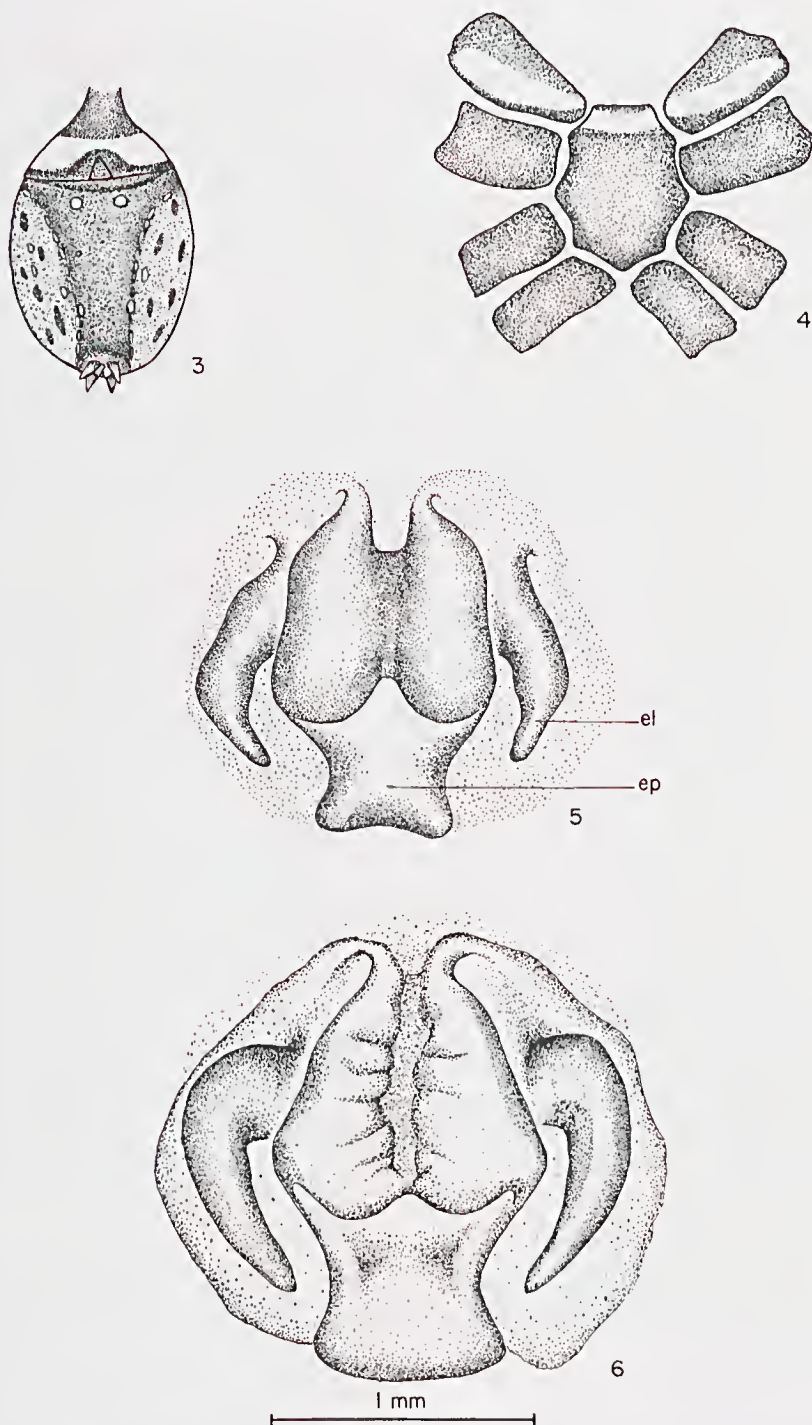
Ctenus villasboasi Mello-Leitão

Ctenus villasboasi Mello-Leitão, 1949:11 (sp. n.), fig. 12. Roewer, 1954:656 (Cat.).

Material-tipo: Holótipo fêmea, 48452 MNRJ, J. C. Mello Carvalho col. abr. 47, confluência dos rios Culuene e Xingu, MT, Brasil.

Diagnose: o padrão de colorido das pernas (mancha retangular clara na face ventral das tíbias I a IV e faixa clara oblíqua ventral nas coxas I) e a morfologia do sistema copulador feminino (epígino e escleritos laterais) caracterizam *Ctenus villasboasi.*

Fêmea — Colorido geral castanho a cinza escuro. Cefalotórax, em dois exemplares, com uma estreita linha clara mediana partindo do intervalo entre os OMP e indo até a margem posterior do cefalotórax, nos outros exemplares sem essa linha; borda lateral do cefalotórax sem ou com pelos acinzentados formando uma faixa marginal contrastante. Esterno, coxas,

EICKSTEDT, V. R. D. von. Aranhas do gênero *Ctenus* coletadas na foz do rio Culuene, Xingu, Brasil: descrição de uma espécie nova e redescrição de *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão (Araneae; Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan,* 44/45:161-169, 1980/81.

Figs. 3 a 6 — *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão. Fig. 3 — padrão de colorido do ventre. Fig. 4 — padrão de colorido do externo e coxas I; Fig. 5 — sistema copulador do holótipo, vista ventral; Fig. 6 — sistema copulador do exemplar 1720 PAC, vista ventral. Abreviaturas: el = esclerito lateral; ep = epígino.

EICKSTEDT, V. R. D. von. Aranhas do gênero *Ctenus* coletadas na foz do rio Culuene, Xingu, Brasil: descrição de uma espécie nova e redescrição de *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão (Araneae; Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:161-169, 1980/81.

lábio, lâminas maxilares e artículo basal das quelíceras de colorido mais escuro. Dorso do abdômen marrom amarelado ocre, com fólio claro dorsal mediano ladeado de dois a três pares de manchas circulares escuras; às vezes, só as manchas escuras são perceptíveis. Lados do abdômen de colorido pardacento, manchado de escuro. Ventre com um triângulo mediano bem escuro, delimitado por duas filas paramedianas de sigilos claros; dentro desse triângulo, dois sigilos claros abaixo do epígino e, próximo a ele, lateralmente, algumas manchas claras, esparsas; epigastro com uma faixa clara transversal um pouco acima do epígino (Fig. 3). Tíbia das pernas I a IV com mancha retangular clara, formada por pelos cinza, na altura do terceiro par de espinhos ventrais nas pernas I e II e do segundo par nas pernas III e IV. Coxa do primeiro par de pernas com uma faixa clara oblíqua atravessando toda a face ventral do artículo, presente também na margem anterior do esterno (Fig. 4). Face dorsal dos artículos das pernas, principalmente dos fêmures, com anéis escuros, nem sempre muito conspícuos. Face ventral do fêmur e da tíbia do palpo com ou sem mancha clara, como nas pernas.

Olhos 2-4-2. Quadrângulo ocular mediano ligeiramente mais longo que largo, um pouco mais estreito na frente. OMA pouco menores que OMP e estes do mesmo tamanho dos OLP. OLA muito pequenos, elípticos. Segunda fila ocular reta ou ligeiramente recurva pelas margens anteriores. Distâncias interoculares: OMA afastados entre si por pouco menos que um diâmetro e dos OMP por um diâmetro. OMP distantes um do outro por um diâmetro. OLA afastados dos OMP e dos OLP cerca de um diâmetro e meio. Clípeo igual a um diâmetro e meio dos OMA. Sulco ungueal das quelíceras com três dentes na promargem (o médio, maior), quatro na retromargem (seguidos de mais um, punctiforme, proximal) e muitas cúspides entre as duas margens. Lábio escavado na base, mais longo que largo, atingindo a metade das lâminas maxilares. Escópula rala em toda a face ventral dos tarsos I a IV e metatarsos I e II, na metade apical do metatarso III e no quarto apical de metatarso IV; tíbias sem escópula ventral (Fig. 8). Artículos do palpo sem escópula lateral anterior. Quetotaxia das pernas e dos palpos: (Fig. 8). Duas garras tarsais nas pernas, com dois a três dentes; tufos subungueais densos, verticais. Palpo com garra ímpar pectinada em fila simples. Epígino alongado, com dois lobos ovais salientes na metade anterior; escleritos laterais ao epígino digitiformes, curvos para dentro, situados na metade da altura do epígino (Figs. 5, 6). Pernas IV-I-II-III. Pat. + tib. I > pat. + tib. IV. Variação do tamanho do corpo (fêmeas adultas): 18 mm-32 mm

Macho: desconhecido.

Distribuição geográfica: BRASIL: *Mato Grosso*: confluência dos rios Culuene e Xingu (localidade-tipo). *Pará*: Belém. EQUADOR: Los Tayos.

Material estudado: além do holótipo, uma fêmea, P. Vanzolini col. ago. 1966, Belém (5658 MZSP); uma fêmea, P. Ashmole col. jul. 76, Los Tayos (78º12'W, 3º10'S), no campo (7 PAC); uma fêmea com ooteca, P. Ashmole col. jul. 76, Los Tayos (78º12'W, 3º10'S), sob casca de árvore (150 PAC); uma fêmea, P. Ashmole col. ago. 76, Los Tayos (78º12'W, 3º$6'S), dentro de gruta (1186 PAC); uma fêmea, P. Ashmole col. ago.

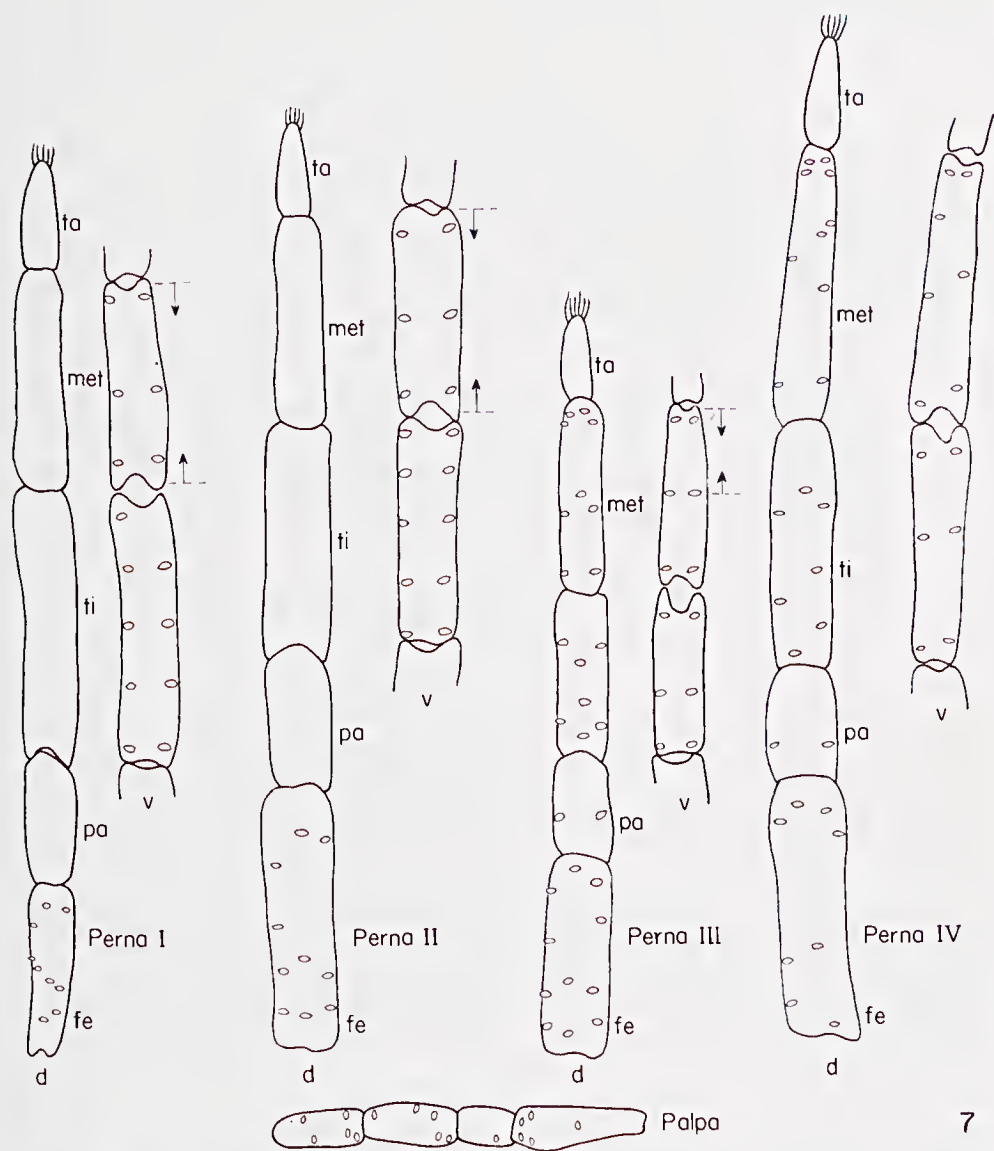



Fig. 7 — *Ctenus carvalhoi* sp. n. — Quetotaxia do palpo e das pernas I-IV e extensão das escópulas ventrais das pernas I-IV. Abreviaturas: d = face dorsal; v = face ventral; fe = fêmur; pa = patela; ti = tíbia; met = metatarso; ta = tarso.

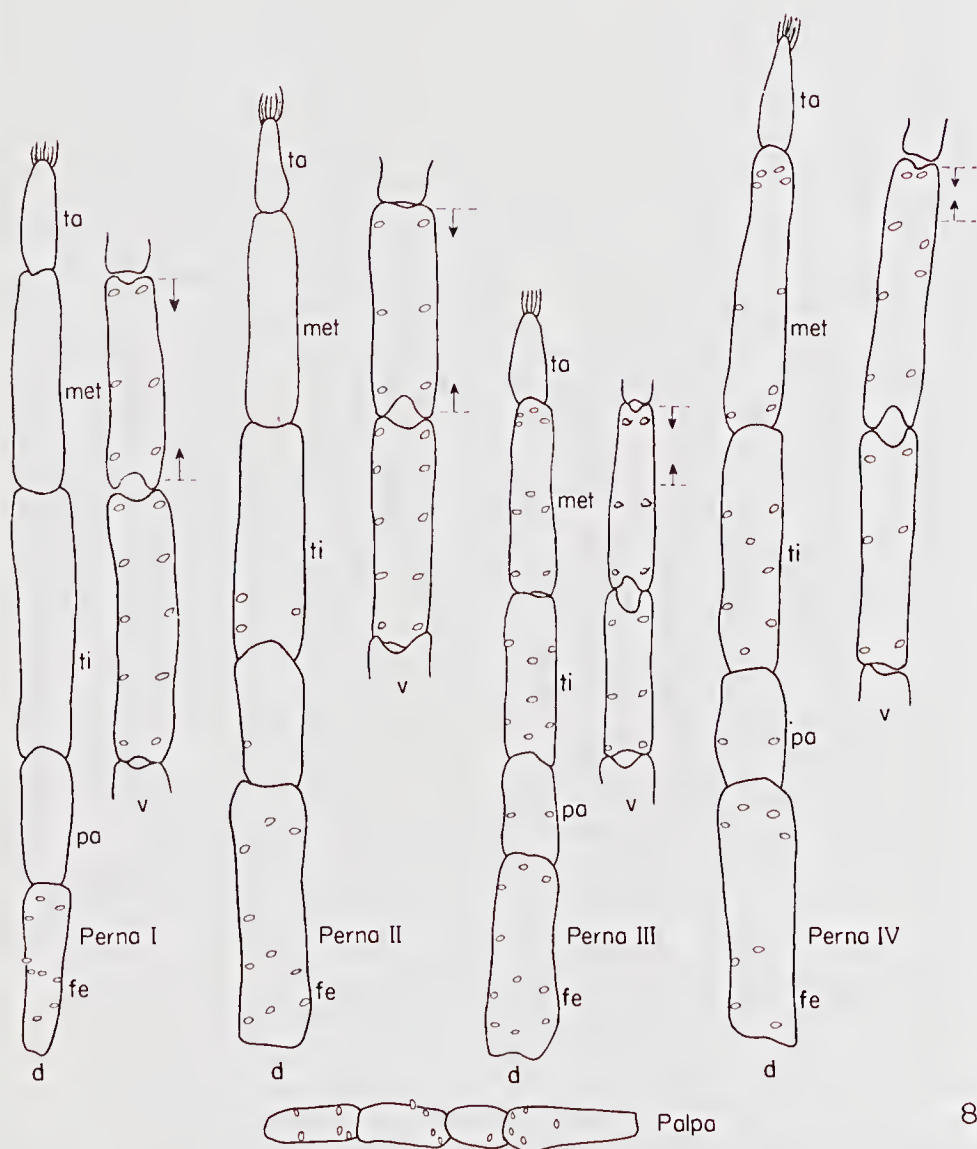



Fig. 8 — *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão — Quetotaxia do palpo e das pernas I-IV e extensão das escópulas ventrais das pernas I-IV. Abreviaturas: d = face dorsal· v = face ventral; fe = fêmur; pa = patela; ti = tíbia; met = metatarso; ta = tarso.

76, Los Tayos, campo Santiago (78°02'W, 3°04'S), perambulando à noite (1720 PAC).

Discussão: na descrição original Mello-Leitão cita um macho como holótipo de *villasboasi*, entretanto a Fig. 12 representa o epígino dessa espécie. No catálogo de Roewer consta que apenas o macho de *villasboasi* é conhecido. O exame do holótipo demonstrou que a espécie está baseada em uma fêmea adulta.

O padrão de colorido das pernas (mancha retangular clara nas tíbias e faixa clara transversal nas coxas I) é um caráter diagnóstico da espécie, entretanto, não foi mencionado na descrição original, apesar de muito conspícuo no holótipo.

AGRADECIMENTOS

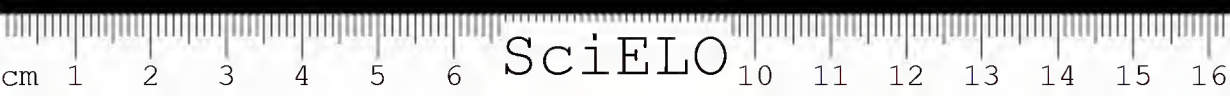
Aos responsáveis pelas coleções, A. Timótheo da Costa (Museu Nacional, Rio de Janeiro), Lícia M. Neme (Museu de Zoologia, São Paulo), F. R. Wanless (British Museum, Londres), M. Hubert (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) e P. Ashmole (University of Edinburgh) agradeço o empréstimo do material que possibilitou a execução deste trabalho.

ABSTRACT: A new species of the genus *Ctenus* (ARANEAE; CTENIDAE) is described based on a female collected at the confluence of the Culuene and Xingu rivers (Mato Grosso, Brazil). The study of five now avaiable specimens of *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão, 1949 allowed its redescription and a better knowledge on the geographic distribution and intraspecific variation of this species that was known up to present only by the type-specimen.

KEYWORDS: Spider systematics; *Ctenus carvalhoi* sp.n.; *Ctenus villasboasi* Mello-Leitão : redescription.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHAMBERLIN, R.V. Notes on generic characters in the *Lycosidae*. *Canad. Entom., 36*:145-148, 173-178, 1904.
2. COMSTOCK, J.H. *The spider book*. New York, Comstock Pub. Associates, 1965. 729 p., 770 figs.
3. MELLO-LEITÃO, C.F. Aranhas da foz do Koluene. *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro (Zool.)*, n.° 92:1-19, figs. 1-21 1949.
4. PICKARD-CAMBRIDGE, F.O. On cteniform spiders from the lower Amazons and other regions of North and South America. *Ann. Mag. Nat. Hist., 19*(6):52-106, pls. III, IV, 1897.
5. ROEWER, C. *Katalog der Araneae*. Bruxelles, Carl S. Bremen, 1954. vol. 2a, 923 p.

Mem. Inst. Butantan
44/45:171-179, 1980/81

REDESCRIÇÃO DOS TIPOS DE *CTENUS SIMILIS*, *CTENUS ALBOFASCIATUS* E *CTENUS MINOR* (ARANEAE; CTENIDAE)

Vera Regina D. von EICKSTEDT *

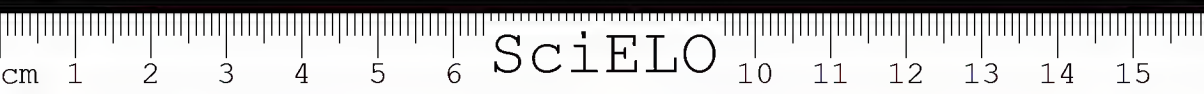
RESUMO: São redescritos os tipos de três espécies amazônicas de aranha do gênero *Ctenus*: *C. similis*, *C. albofasciatus* e *C. minor*. Para cada uma constam a bibliografia correspondente à sistemática da espécie e a redescrição, acompanhada de comentários e ilustrações. As espécies em estudo são representadas até o momento apenas pelos exemplares-tipo. Verificou-se que o espécime relacionado por Mello-Leitão (1949) sob *C. similis* não é co-específico com o holótipo dessa espécie; ele pertence a uma espécie nova do gênero, descrita sepaardamente. (Eickstedt, V. R. D. 1980/81)

PALAVRAS-CHAVE: Sistemática de aranha; *Ctenus similis; Ctenus albofasciatus; Ctenus minor;* redescrição de tipos.

INTRODUÇÃO

A família CTENIDAE (ARANEAE, LABIDOGNATHA) é representada por 65 gêneros; mais da metade das 400 espécies de ctenídeos mencionadas na literatura estão incluídas no gênero nominativo da família, *Ctenus*. Esse "status" taxonômico decorre do fato de que tanto os gêneros quanto as espécies estão, em geral, mal caracterizados, induzindo os autores à criação contínua de novas entidades. Por outro lado, a definição precária do próprio gênero-tipo permite incluir sob ele a maioria das espécies descritas.

O exame dos espécimes-tipo das espécies mais antigas e a redescrição delas baseadas nos caracteres morfológicos atualmente considerados de valor para o reconhecimento específico, notadamente as genitálias masculina e feminina, constituem o primeiro passo para uma posterior revisão da sistemática dessa família. Com este objetivo são redescritas as espécies amazônicas *Ctenus similis*, *Ctenus albofasciatus* e *Ctenus minor*.

* Seção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan. Endereço para correspondência: CEP 05504 — Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados os exemplares-tipo das três espécies em questão, pertencentes ao British Museum of Natural History (Londres) e um espécime do Museu Nacional (Rio de Janeiro) determinado por Mello--Leitão (1949) como *Ctenus similis* Pickard-Cambridge.

De cada aranha foram examinados os caracteres morfológicos externos e o colorido e tomadas as dimensões corporais costumeiramente usadas em araneologia. A quetotaxia de cada espécie foi representada graficamente através de um mapeamento da inserção dos espinhos em cada artículo dos quatro pares de pernas e do palpo. A extensão das escópulas ventrais das pernas foi assinalada juntamente com a espinulação. A fim de não prejudicar o material-tipo apenas a face ventral da genitália externa foi desenhada, com auxílio de câmara clara acoplada ao estereomicroscópio. As ilustrações foram feitas pelo autor e passadas a nanquim pela Sra. Delminda Travassos, desenhista do Instituto Butantan.

Abreviaturas usadas: C = citação; Cat = catálogo; Ch = chave; L = lista (na bibliografia precedente a cada espécie). OMA = olhos médios anteriores; OMP = olhos médios posteriores; OLA = olhos laterais anteriores; OLP = olhos laterais posteriores; pat. + tib. = patela + tíbia (na redescrição das espécies).

Ctenus similis Pickard-Cambridge

Ctenus similis Pickard-Cambridge, 1897: 55 (L), 77 (Ch), 83 (sp.n.), pl. 3; figs. lc, 4a Pickard-Cambridge, 1902: 411 (Ch), 413 (L). Petrunkevitch, 1911 : 477 (Cat.) Mello-Leitão, 1936: 4 (Ch), 13 (C). Mello-Leitão, 1949 : 11 (C). Roewer, 1954: 655 (Cat.). Bonnet, 1956 : 1289 (Cat.).

Material-tipo: Holótipo fêmea, 1896.12.13.102 BMNH (Londres), F. O. Pickard-Cambridge e E. E. Austen col. 1896, floresta de Santarém, Pará, Brasil.

Fêmea: Colorido geral castanho claro. Cefalotórax com vestígio de uma faixa longitudinal de pelos amarelados na região mediana, mais nítida no terço posterior. Esterno, lábio, lâminas maxilares e coxas das pernas cor de palha. Abdômen cinza escuro com uma faixa longitudinal serrilhada, mediana dorsal, formada por pelos claros, chegando até quase às fiandeiras; ventre cinza amarelado uniforme.

Olhos 2-4-2. Quadrângulo ocular mediano tão largo quanto longo, ligeiramente mais estreito na frente. Clípeo do tamanho do diâmetro dos OMA. Segunda fila ocular procurva, uma tangente à margem anterior dos OMP cortando os OLA pela metade. OMA pouco menores que OMP, de tamanho igual ao dos OLP. OLA elípticos, menores que os outros. OLA e OLP em um cômoro comum. Distâncias interoculares: OMA distanciados entre si e dos OMP por um seu raio. OLA distantes dos OMP pelo seu menor diâmetro e dos OLP pelo seu maior diâmetro. Sulco ungueal das quelíceras com 3 dentes na promargem (o médio, maior) e 4 na retromargem, seguidos de dois dentículos, proximais, punctiformes. Lábio mais longo que largo, escavado na base, atingindo a metade da altura das lâminas maxilares. Pernas IV-I-II-III. Pat. +

tib. I = pat. + tib. IV. Escópula rala em toda extensão da face ventral dos tarsos I a IV e metatarsos I e II e na metade apical do metatarso III (Fig. 1). Artículos do palpo sem escópula lateral anterior. Quetotaxia dos palpos e das pernas: (Fig. 1). Duas garras tarsais com três a quatro dentes; tufos subungueais densos, verticais. Epígino mais largo que longo, ocupando quase todo o epigastro; escleritos laterais próximos ao epígino, em forma de gancho, situados na metade da altura do epígino (Fig. 4). Comprimento do corpo: 12 mm.

Macho: desconhecido.

Distribuição geográfica: espécie conhecida apenas da localidade-tipo.

Material examinado: somente o holótipo.

Discussão: Mello-Leitão (1936:13), ao relacionar *similis* entre as espécies brasileiras de *Ctenus*, forneceu referências bibliográficas relativas a *sinuatipes* Pickard-Cambridge, 1897, e não a *similis*. No catálogo de Roewer (1954:655) ocorre o mesmo fato. O engano feito por estes dois autores refere-se apenas às citações bibliográficas correspondentes às duas espécies: *sinuatipes* é espécie válida, da América Central (Costa Rica), facilmente distinta de *similis* pela forma da genitália feminina.

Somente dois exemplares de *similis* são mencionados na literatura: o tipo, capturado pelo autor da espécie na floresta de Santarém e um espécime coletado por Mello Carvalho na confluência dos rios Culuene e Xingu, Mato Grosso (Mello-Leitão, 1949). Tive oportunidade de examinar este último exemplar, depositado no Museu Nacional do Rio de Janeiro (n.º 48450); ele não pertence à espécie *similis* e sim a uma espécie nova do gênero descrita separadamente (Eickstedt, V.R.D., 1980/81). Portanto, *similis* é representada até agora unicamente pelo exemplar-tipo.

Ctenus albofasciatus Pickard-Cambridge

Ctenus albofasciatus Pickard-Cambridge, 1897:55 (L), 77 (Ch), 82 (sp.n.), pl. 3: figs. ld, 4b. Pickard-Cambridge, 1902:411 (Ch), 412 (L). Petrunkevitch, 1911:470 (Cat.) Roewer, 1954:647 (Cat.). Bonnet, 1956:1274 (Cat.).

Material-tipo: Holótipo fêmea, 1896, 12.13.99 BMNH (Londres), F. O. Pickard-Cambridge col. fev. 1896, floresta de Santarém, Pará, Brasil.

Fêmea: Colorido geral castanho escuro. Cefalotórax com um losango claro formado por pubescência cinza dourada que se inicia entre os olhos laterais posteriores e termina na altura do sulco torácico; em continuação, uma estreita linha mediana longitudinal de pelos claros indo até a base do cefalotórax. Partindo do espaço entre os OMP e os OLP, uma faixa clara que percorre o clípeo até a borda anterior do cefalotórax. Dorso do abdômen escuro, com uma faixa de lados sinuosos pardo-amarelada, longitudinal mediana, que esmaece em direção às fiandeiras; região basal bem escura dos dois lados (Fig. 5). Ventre denegrido, com quatro filas de sigilos circundados por pelos claros.

Olhos 2-4-2. Quadrângulo ocular mediano tão largo quanto longo, ligeiramente mais estreito na frente. Clípeo do tamanho do diâmetro dos OMA. Segunda fila ocular ligeiramente recurva pelas margens anteriores. OMA pouco menores que os OMP e estes um pouco maiores que os OLP. OLA

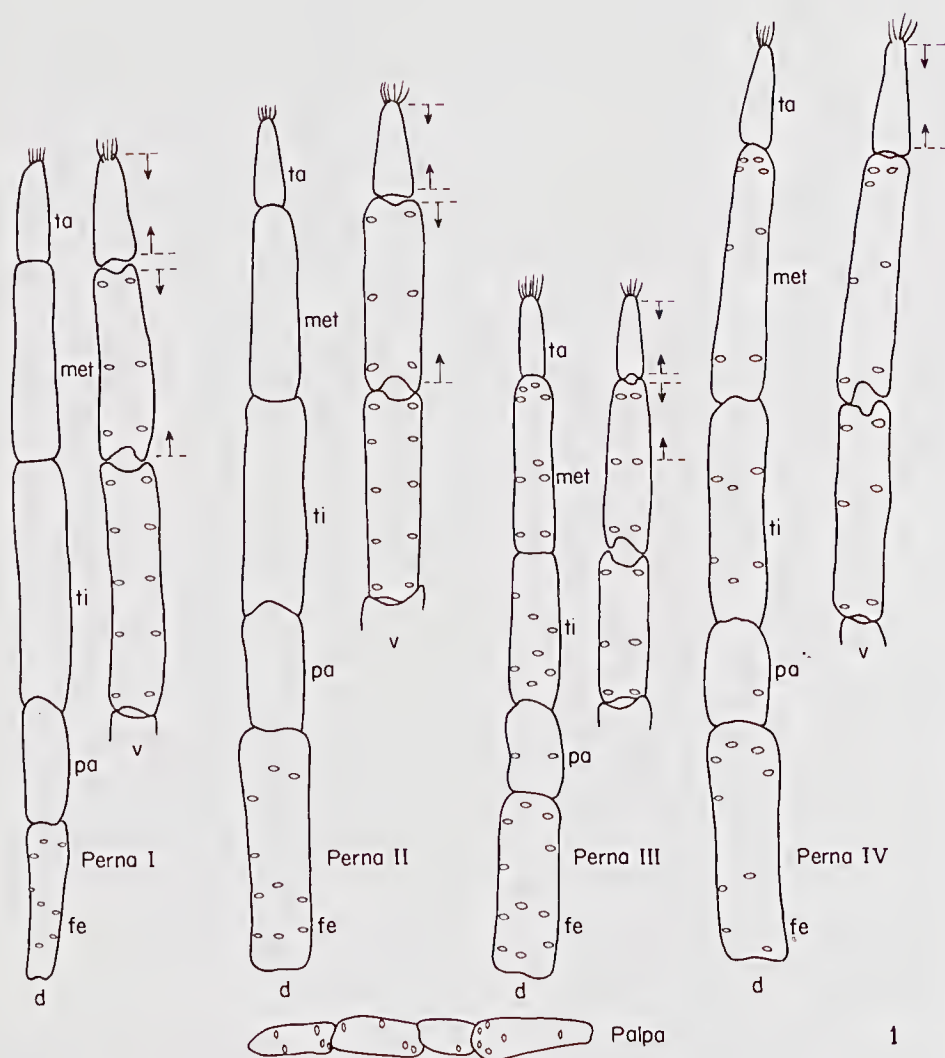



Fig. 1 — *Ctenus similis* Pickard-Cambridge — Quetotaxia do palpo e das pernas I-IV e extensão das escópulas ventrais das pernas I-IV. Abreviaturas: d = face dorsal; v = face ventral; fe = fêmur; pa = patela; ti = tíbia; met = metatarso; ta = tarso.

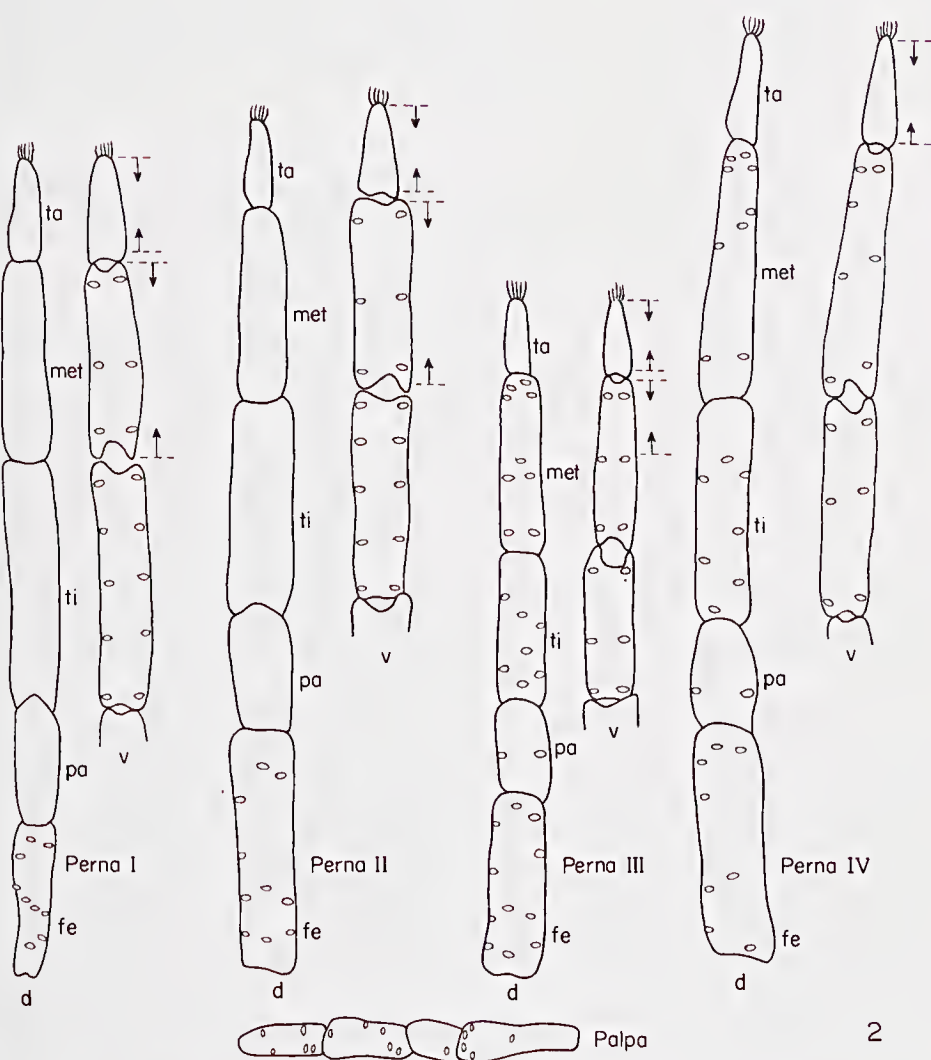



Fig. 2 — *Ctenus albofasciatus* Pickard-Cambridge — Quetotaxia do palpo e das pernas I-IV e extensão das escópulas ventrais das pernas I-IV. Abreviaturas: d = face dorsal; v = face ventral· fe = fêmur; pa = patela; ti = tíbia; met = metatarso; ta = tarso.

muito pequenos, elípticos, seu diâmetro maior não atingindo a metade do diâmetro dos OLP. Distâncias interoculares: OMA afastados entre si e dos OMP por um seu raio. OMP afastados entre si por um raio. OLA distantes dos OMP pelo seu maior diâmetro e dos OLP por duas vezes seu maior diâmetro. OLA e OLP em cômoro comum. Sulco ungueal das quelíceras com três dentes na promargem e quatro na retromargem, seguidos de mais um, punctiforme, proximal. Lábio mais longo que largo, escavado na base, atingindo a metade da altura das lâminas maxilares. Pernas IV-I-II-III. Pat. + tib. I = pat. + tib. IV. Escópula rala em toda a extensão da face ventral dos tarsos I a IV e metatarsos I e II e na metade apical do metatarso III (Fig. 2). Artículos do palpo sem escópula no lado interno. Quetotaxia dos palpos e das pernas : (Fig. 2). Duas garras tarsais; um par de tufos subungueais densos, verticais. Epígino de base ovalada e com duas projeções anteriores, dirigidas para os lados, afiladas no ápice; escleritos laterais em forma de gancho, sobrepostos à parte basal do epígino (Fig. 6).

Comprimento do corpo : 14 mm.

Macho: desconhecido.

Distribuição geográfica: espécie conhecida apenas da localidade-tipo.

Material examinado: o holótipo e um parátipo (fêmea adulta) com o mesmo n.º e procedência do holótipo.

Ctenus minor Pickard-Cambridge.

Ctenus minor Pickard-Cambridge, 1897: 55 (L), 77 (Ch), 83 (sp.n.), pl. 3: fig. 4c. Pickard-Cambridge, 1902: 411 (Ch), 412 (L). Petrunkevitch, 1911: 475 (Cat.). Mello-Leitão, 1936: 4 (Ch), 11 (C). Roewer, 1954: 652 (Cat.). Bonnet, 1956: 1285 (Cat).

Material-tipo: Holótipo fêmea, 1896.12.13.100 BMNH (Londres), F. O. Pickard-Cambridge col. 1896, floresta de Santarém, Pará, Brasil.

Fêmea: Colorido geral marrom amarelado. Cefalotórax com uma faixa longitudinal mediana de pelos amarelados pouco nítida. Abdômen pardo, com faixa clara denteada longitudinal mediana e manchas de pelos amarelados, irregularmente dispostas, nas regiões dorsolateral e látero-ventral (Fig. 7). Ventre amarelado. Pernas com manchas de pelos louros.

Olhos 2-4-2. Quadrângulo ocular mediano ligeiramente mais largo que longo, pouco mais estreito na frente. Clípeo cerca de um diâmetro do OMA. Segunda fila reta ou ligeiramente recurva pelas margens anteriores, conforme se olha o exemplar. OMA pouco menores que os dos OMA. Segunda fila reta ou ligeiramente recurva pelas margens elípticos. Distâncias interoculares: OMA distantes entre si por um pouco menos que um seu diâmetro e dos OMP por um seu raio. OLA distantes dos OMP pelo seu maior diâmetro e dos OLP por um diâmetro e meio. OMP afastados entre si por quase um diâmetro. Sulco ungueal das quelíceras com três dentes na promargem (o médio, maior) e quatro na retromargem. Lábio mais longo que largo, escavado na base, atingindo a metade da altura das lâminas maxilares. Pernas IV-I-II-III. Pat. + tib. I = pat. + tib. IV. Escópula rala em toda extensão da face ventral dos tarsos e metatarsos I e II e na metade distal do metatarso III (Fig. 3). Artículos do palpo sem escópula lateral anterior. Queto-

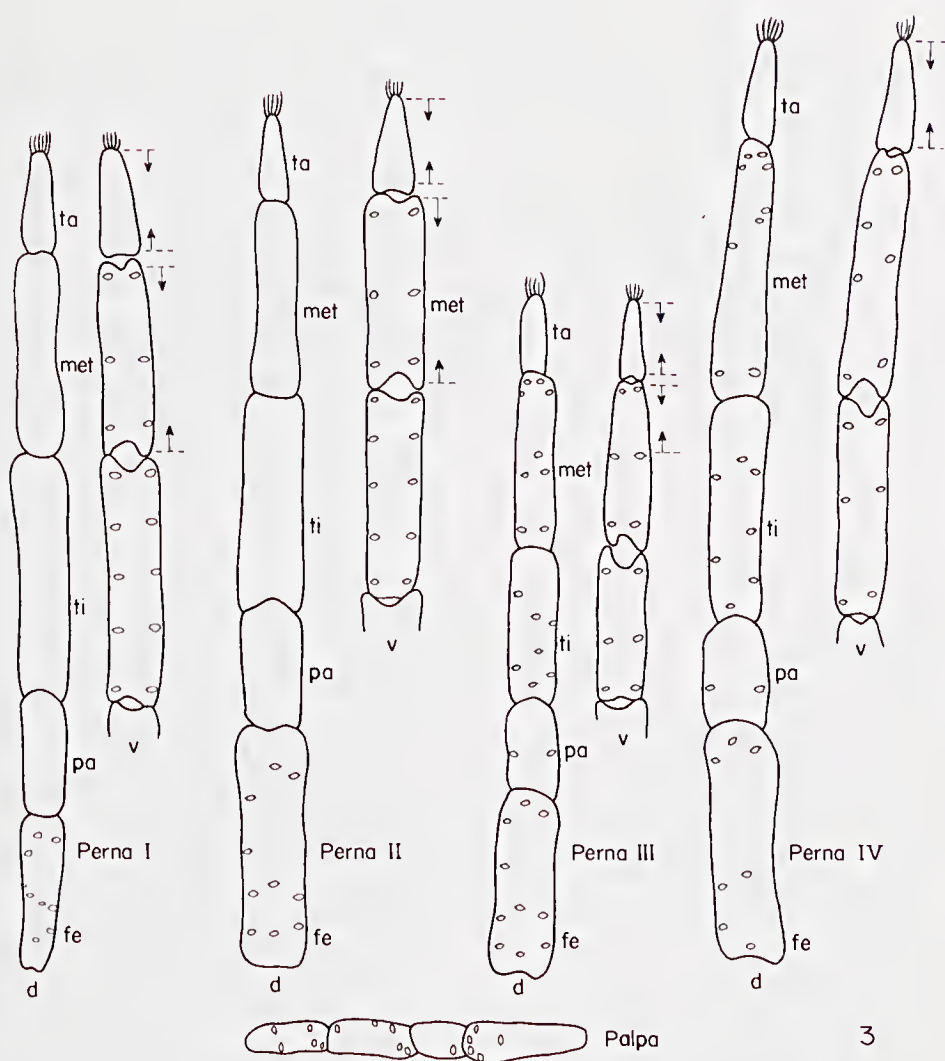



Fig. 3 — *Ctenus minor* Pickard-Cambridge — Quetotaxia do palpo e das pernas I-IV e extensão das escópulas ventrais das pernas I-IV. Abreviaturas: d = face dorsal; v = face ventral; fe = fêmur; pa = patela; ti = tíbia; met = metatarso; ta = tarso.

EICKSTEDT, V. R. D. von. Redescrição de *Ctenus similis*, *Ctenus albofasciatus* e *Ctenus minor* (Araneae; Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:171-179, 1980/81.

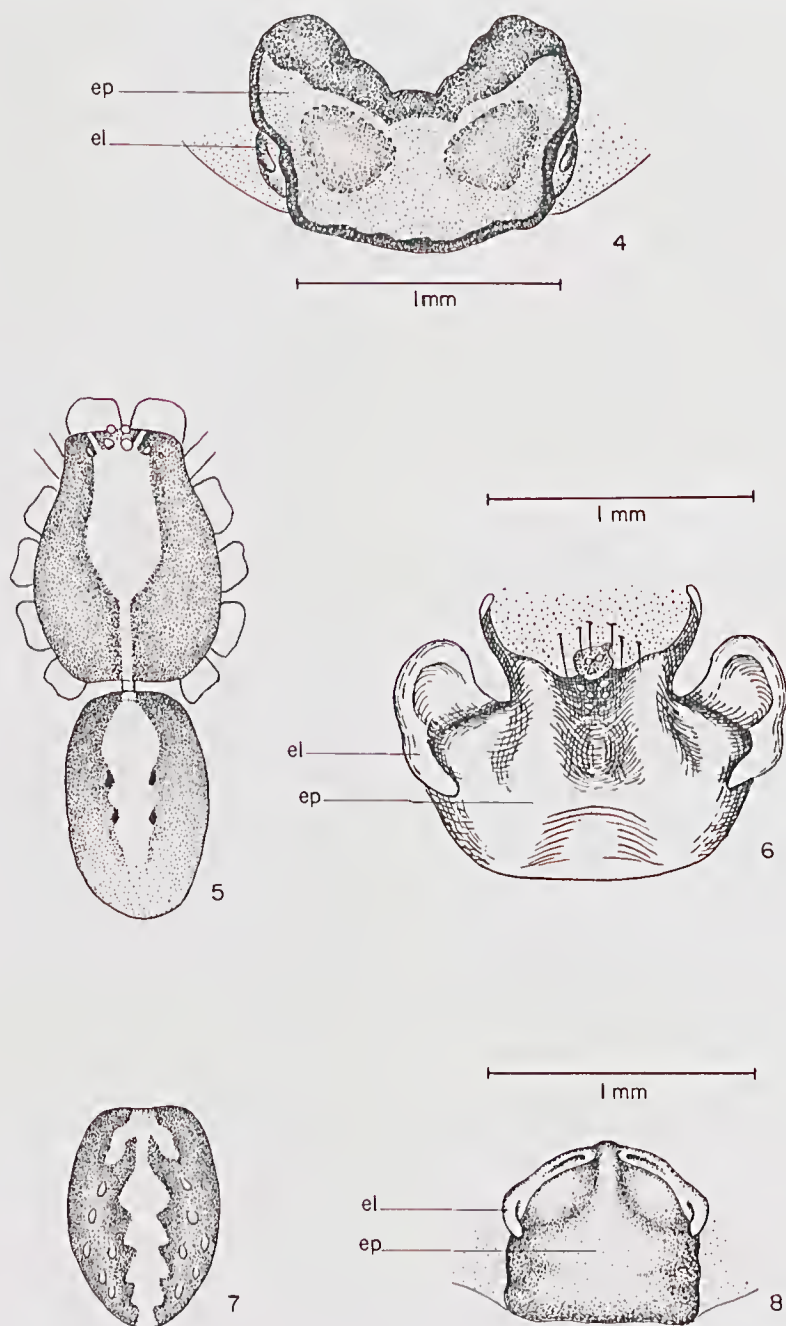



Fig. 4 — *Ctenus similis* Pickard-Cambridge — Sistema copulador do holótipo, vista ventral.

Figs. 5 e 6 — *Ctenus albofasciatus* Pickard-Cambridge — Fig. 5 — padrão do colorido dorsal; Fig. 6 — sistema copulador do holótipo, vista ventral.

Figs. 7 e 8 — *Ctenus minor* Pickard-Cambridge — Fig. 7 — padrão do colorido dorsal; Fig. 8 — sistema copulador do holótipo, vista ventral.

Abreviaturas: el = esclerito lateral; ep = epígino; rs = receptáculo seminal (por transparência).

taxia dos palpos e pernas: (Fig. 3). Duas garras tarsais; um par de tufos subungueais densos, verticais. Epígino pentagonal, com lobos laterais ovalados na parte anterior; escleritos laterais semelhantes a gancho, sobrepostos à borda anterior do epígino (Fig. 8).

Comprimento do corpo : 11 mm.

Macho: desconhecido.

Distribuição geográfica: espécie conhecida apenas da localidade-tipo.

Material examinado: o holótipo.

AGRADECIMENTOS

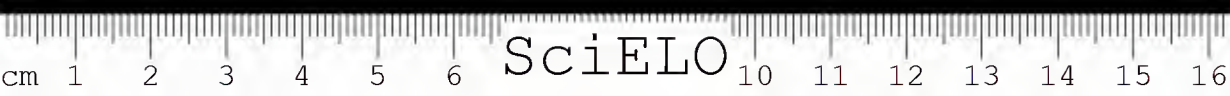
Ao Dr. F. R. Wanless (British Museum Natural History) e à Dra. Anna Timotheo da Costa (Museu Nacional) agradeço o empréstimo do material que possibilitou a execução deste trabalho.

ABSTRACT: The type-specimens of the amazonean spider species *Ctenus similis* Pickard-Cambridge, *Ctenus albofasciatus* Pickard-Cambridge, and *Ctenus minor* Pickard-Cambridge (LABIDOGNATHA; CTENIDAE) are redescribed. For each species the pertinent systematic bibliography and the redescription with comments and illustrations are given. Up to now the three species are represented only by the type-specimnes. The spider from the Culuene River (Xingu) listed by Mello-Leitão (1949) as *Ctenus similis* is not co-specific with the holotype; it was separately dsecribed as a new species (Eickstedt, V.R.D., 1980/81).

KEYWORDS: Spider systematics; *Ctenus similis, Ctenus albofasciatus, Ctenus minor* : redescription.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BONNET, P. *Bibliographia Araneorum.* Toulouse, Douladoure Impr., 1956. vol. 2 (2.ª parte), p. 919-1926.
2. EICKSTEDT, V.R.D. Aranhas do gênero *Ctenus* coletadas na foz do rio Culuene, Xingu, Brasil: descrição de uma espécie nova e redescrição de *Ctenus villasboasi.* Mello-Leitão (Araneae, Ctenidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*: 161-170, 1980/81.
3. MELLO-LEITÃO, C.F. Contribution à l'étude des Ctenides du Brésil. *Fetschr. Strand, 1*:1-31, 1936.
4. MELLO-LEITÃO, C.F. Aranhas da foz do Koluene. *Bol. Mus. nac. Rio de Janeiro (Zool.),* (92):1-19, 1949.
5. PETRUNKEVITCH, A. A synonimic index-catalogue of spiders of North, Central and South America with all adjacent islands, Greenland, Bermudas, West Indies, Terra del Fuego, Galapagos, etc. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 29*:1-791, 1911.
6. PICKARD-CAMBRIDGE, F.O. On cteniform spiders from the lower Amazons and other regions of North and South America. *Ann. Mag. Nat. Hist., 19*(6):52-106, 1897.
7. PICKARD-CAMBRIDGE, F.O. New species of spiders belonging to the genus *Ctenus*, with supplementary notes. *Ann. Mag. Nat. Hist., 9*(7):401-415, 1902.
8. ROEWER, C. *Katalog der Araneae.* Bruxelles, Carl S. Bremen, 1954. vol. 2a, 923 p.

Mem. Inst. Butantan
44/45:181-190, 1980/81

A PROPÓSITO DA INDICAÇÃO DE UM NEÓTIPO PARA *TITYUS SERRULATUS* LUTZ E MELLO, 1922 (SCORPIONES; BUTHIDAE)

Wilson R. LOURENÇO *
Vera Regina D. von EICKSTEDT **

RESUMO: É proposto um neótipo para *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922, espécie de escorpião descrita de Belo Horizonte, Minas Gerais. As tentativas feitas para localização do tipo, originalmente depositado no Instituto Ezequiel Dias (Belo Horizonte), mostraram-se infrutíferas, levando-nos a crer que o mesmo se encontre definitivamente perdido. O neótipo proposto neste artigo, depositado na coleção aracnológica do Instituto Butantan, obedece a todos os critérios exigidos pelo Artigo 75 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica.

PALAVRAS-CHAVE: *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922; Buthidae; neótipo.

INTRODUÇÃO

Lutz e Mello (1922) publicaram a descrição de cinco espécies novas de escorpião pertencentes à família *Buthidae*, entre as quais *Tityus serrulatus*, indicando Belo Horizonte como localidade típica dessa espécie.

Após a descrição original, sucederam-se algumas redescrições: Mello-Campos (1924), Vellard (1932), Pessôa (1935) e Mello-Leitão (1945). Com exceção de Pessôa (1935), que analisou a variabilidade de alguns caracteres, nenhum dos outros autores apresentou qualquer acréscimo substancial ao conhecimento de *Tityus serrulatus*; além disso, em nenhum dos casos é citado o estudo do tipo.

No trabalho original, Lutz e Mello (1922) indicaram "Loc: Bello Horizonte. Collecção da filial naquella capital.", ou seja, o tipo teria sido depositado no Instituto Ezequiel Dias, filial do Instituto Oswaldo Cruz,

* "Attaché" do Laboratoire de Zoologie (Arthropodes), Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Endereço para correspondência: 61, Rua de Buffon, 75231, Paris, França.

** Pesquisador científico da Seção de Artrópodos Peçonhentos do Instituto Butantan. Endereço para correspondência: CEP 05504, C. Postal 65, São Paulo, Brasil.

do Rio de Janeiro. Todas as tentativas feitas por um de nós (WRL) desde 1975 para localizar o referido tipo não tiveram sucesso, levando-nos a concluir que ele deva se encontrar definitivamente perdido. Visto ser *Tityus serrulatus* a espécie de maior importância médica no Brasil e possivelmente em toda a América do Sul, pareceu-nos oportuna a criação de um neótipo, a ser depositado na coleção aracnológica do Instituto Butantan (São Paulo), onde é fabricado o soro antiveneno correspondente a esta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

São estudados comparativamente cinqüenta e um exemplares topótipos de *Tityus serrulatus* e um deles é selecionado como neótipo fêmea, de acordo com todos os critérios exigidos pelo Artigo 75 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. A escolha de um macho como exemplar-tipo é sempre preferível, entretanto, *Tityus serrulatus* é espécie partenogenética, apresentando unicamente fêmeas em suas populações (Matthiesen, 1962; San Martin e Gambardella, 1966).

A análise estatística de alguns dos caracteres morfológicos estudados é feita segundo Lamotte (1971).

Material estudado: BRASIL: *Minas Gerais*, Belo Horizonte, H. C. Cunha col. jul. 1980, 45 fêmeas (IB-SC 1158 a 1202); C. Diniz col. maio 1980, 6 fêmeas (IB-SC 1203 a 1208).

Tityus serrulatus Lutz e Mello, 1922.

Tityus serrulatus Lutz e Mello, 1922, *Folha médica, 3*(4):25.
Tityus serrulatus: Mello-Campos, 1924, *Mem. Inst. Osw. Cruz, 17*(2):267.
Tityus stigmurus: Vellard, 1932, *Mém. Soc. zool. France, 29*(6):553.
Tityus serrulatus: Pessôa, 1935, *An. paul. Med. Cir., 29*(5):430.
Tityus serrulatus vellardi Mello-Leitão, 1939, *Physis, 17*:69.
Tityus serrulatus: Mello-Leitão, 1945, *Arq. Mus. nac., 40*:393.
Tityus serrulatus vellardi: Mello-Leitão, 1945, *Arq. Mus. nac., 40*:396.

Neótipo fêmea, H. C. Cunha col. jul. 1980, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, IB-SC 1165 (Figs. 1 e 2).

Colorido: colorido geral amarelado. Placa prossomial amarela com manchas castanho escuras formando desenhos regulares; na região anterior elas se unem delimitando um triângulo com a base dirigida anteriormente. Cômoro ocular quase negro. Tergitos I a VI com manchas confluentes de colorido castanho escuro, mais acentuadas na borda posterior dos tergitos; tergito VII com uma mancha central em forma de triângulo estreito de base voltada para a região anterior. Todos os segmentos do metassoma amarelos, os dois últimos ligeiramente mais escuros. Face dorsal de todos os segmentos sem manchas. Face ventral do quinto seg-

LOURENÇO, W. R. & EICKSTEDT, V. R. D. von. A propósito na indicação de um neótipo para *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922 (Scorpiones; Buthidae). *Mem. Inst. Butantan* 44/45:181-190, 1980/81.

Figs. 1 e 2 — *Tityus serrulatus*, neótipo. Fig. 1 — vista dorsal; Fig. 2 — vista ventral.

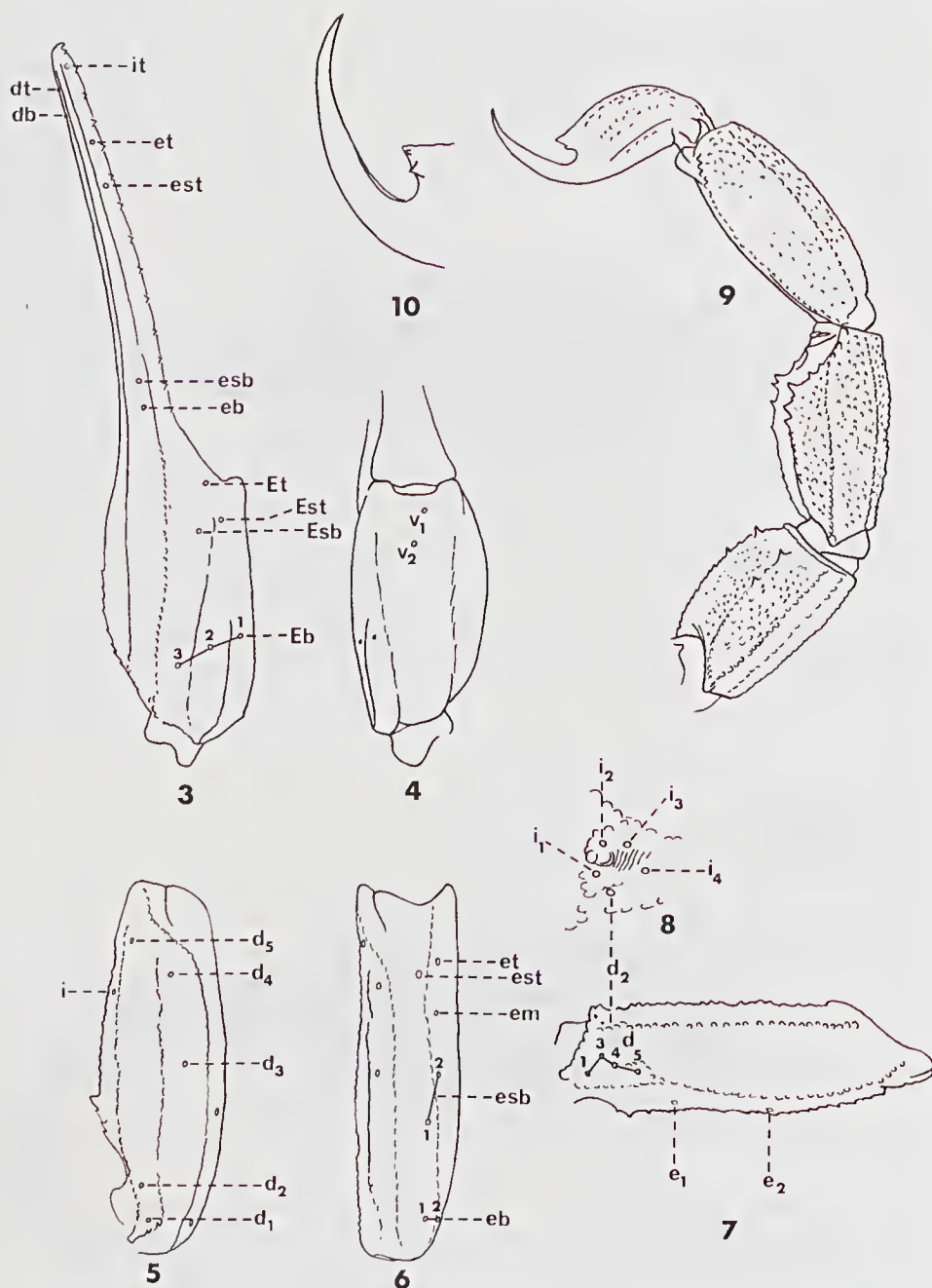
LOURENÇO, W. R. & EICKSTEDT, V. R. D. von. A propósito na indicação de um neótipo para *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922 (Scorpiones; Buthidae). *Mem. Inst. Butantan 44/45*:181-190, 1980/81.

Figs. 3 a 8 — Tricobotriotaxia do neótipo de *Tityus serrulatus*. Fig. 3 — pinça, vista externa. Fig. 4 — pinça, vista ventral; Fig. 5 — tíbia, vista dorsal; Fig. 6 — tíbia, vista externa; Fig. 7 — fêmur, vista dorsal; Fig. 8 — detalhe do fêmur, vista interna.

Fig. 9 — Segmentos caudais III a V e vesícula do neótipo de *Tityus serrulatus* mostrando os grânulos espiniformes dos segmentos III e IV.

Fig. 10 — Aguilhão em detalhe.

mento caudal com uma mancha de colorido castanho denegrido na metade posterior, estendendo-se sobre a crista axial na metade anterior; segmentos II a IV com mancha semelhante que se prolonga sobre as cristas ventrais, sendo bem mais acentuada nos segmentos III e IV; região posterior do segmento IV com algumas manchas também sobre as cristas látero-ventrais. Vesícula da mesma cor que o quinto segmento caudal. Aguilhão com base amarelada e extremidade avermelhada, ligeiramente denegrida. Esternitos amarelo-ocre; cristas do esternito VII com dois esboços de manchas castanhas. Pentes, opérculo genital, esterno, ancas e lobos maxilares de colorido amarelo-ocre. Pernas amarelo-palha uniforme com nuances avermelhadas sobre as cristas. Palpos de colorido amarelo mais escuro que o das pernas, com alguns esboços de manchas pardacentas sobre as cristas, principalmente da tíbia e da pinça; dedos bem mais escuros, castanho denegridos. Quelíceras amarelo-ocre; dedos castanho-pardamentos com dentes denegridos.

Morfologia: *Prossoma* — borda frontal da placa prossomial com entalhe pouco profundo. Cômoro ocular anterior em relação ao centro da placa prossomial. Olhos medianos separados por pouco mais que um diâmetro ocular; três olhos lateriais. Cristas do prossoma (Vachon, 1952:50): cristas oculares medianas, que formam o sulco interocular, bem acentuadas; cristas oculares laterais partindo da borda dorsal dos olhos laterais e continuando em direção aos olhos medianos por uma distância menor que a metade do intervalo entre os olhos laterais e olhos medianos; cristas medianas posteriores delimitando aproximadamente um quadrado na região póstero-mediana da placa prossomial. Graduação geral da placa prossomial entre média a grosseira. *Mesossoma*: tergitos com granulação semelhante à da placa prossomial, porém mais intensa na região posterior de cada tergito. Crista axial presente e bem acentuada em todos os tergitos. Tergito VII com granulação um pouco mais fina que a dos demais e apresentando cinco cristas: uma axial, reduzida à metade, duas medianas praticamente completas e pouco sinuosas e duas laterais, incompletas e ligeiramente curvas (as medianas e as laterais quase se encontram na região látero-anterior do tergito). *Metassoma*: segmentos I e II com dez cristas, III e IV com oito cristas e segmento V com cinco cristas. Cristas intermediárias do segmento II incompletas na região anterior; cristas dorsais dos segmentos III e IV com grânulos mais desenvolvidos, espiniformes, na região posterior, sendo dois grânulos de tamanho médio nas cristas dorsais do segmento III e três grandes nas cristas dorsais do quarto segmento. Tegumento entre as cristas com granulação média, a do quinto segmento caudal menos acentuada. Télson: vesícula desprovida de cristas laterais e com crista mediana ventral pouco acentuada; espinho ventral do aguilhão bem desenvolvido, com dois grânulos dorsais. *Pentes* com 22-23 dentes; lâmina intermediária basilar não dilatada. *Pedipalpos*: fêmur com cinco cristas completas; tíbia com sete cristas completas, a dorsal interna apresentando grânulos espiniformes dos quais o proximal é o mais desenvolvido; pinça com nove cristas, quatro estendendo-se ao longo do dedo fixo; gume do dedo móvel com 16-16 séries de grânulos; ausência de lobo basilar. *Quelíceras*: dedos fixo e móvel com a dentição normal dos *Buthidae* (Vachon, 1963). *Tricobotriotaxia*: as figuras 3 a 8 representam o número e a disposição das tricobótrias dos pedipalpos.

LOURENÇO, W. R. & EICKSTEDT, V. R. D. von. A propósito na indicação de um neótipo para *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922 (Scorpiones; Buthidae). *Mem. Inst. Butantan 44/45*:181-190, 1980/81.

Devem ser assinalados os seguintes aspectos: a) presença de cinco tricobótrias na base do fêmur, face interna, devido à migração para esta face da tricobótria dorsal d_2 (Fig. 8) ; b) tricobótrias *dt* e *db* distais em relação a *et* (Fig. 3) ; c) tricobótrias *et* e *em* da face externa da tíbia situadas do mesmo lado em relação à crista externa (Fig. 6) ; d) tricobótrias d_1, d_3 e d_4 da tíbia, face dorsal, situadas do mesmo lado em relação à crista mediana dorsal (Fig. 5) ; e) as duas tricobótrias externas do fêmur, e_1 e e_2 são distais em relação a d_5 (Fig. 7) ; f) tricobótrias *esb* (dedo fixo), Esb e Eb_3 (mão) e d_2 (fêmur) pequenas, com cerda curta.

TABELA 1

Dimensões corporais do neótipo de *Tityus serrulatus* (em mm)

Comprimento total	67,0
Pressoma — comprimento	6,9
Prossoma — largura anterior	4,7
Prossoma — largura posterior	7,6
Mesossoma — comprimento total	22,0
Metassoma — comprimento total	38,1
Segmento caudal I — comprimento	4,9
Segmento caudal I — largura	4,1
Segmento caudal II — comprimento	5,7
Segmento caudal II — largura	4,1
Segmento caudal III — comprimento	6,1
Segmento caudal III — largura	4,1
Segmento caudal IV — comprimento	6,6
Segmento caudal IV — largura	4,2
Segmento caudal V — comprimento	7,7
Segmento caudal V — largura	3,9
Segmento caudal V — altura	3,2
Télson — comprimento	7,1
Vesícula — comprimento	4,2
Vesícula — largura	2,5
Vesícula — altura	2,4
Aguilhão — comprimento	2,9
Pedipalpo — comprimento total	27,0
Fêmur — comprimento	6,9
Fêmur — largura	2,0
Tíbia — comprimento	7,4
Tíbia — largura	2,6
Pinça — comprimento	12,7
Pinça — largura	2,7
Pinça — altura	2,4
Dedo móvel — comprimento	8,4

LOURENÇO, W. R. & EICKSTEDT, V. R. D. von. A propósito na indicação de um neótipo para *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922 (Scorpiones; Buthidae). *Mem. Inst. Butantan 44/45*:181-190, 1980/81.

ANÁLISE DA VARIABILIDADE DE ALGUNS CARACTERES MORFOLÓGICOS DE *TITYUS SERRULATUS*

A análise dos 51 exemplares topótipos estudados mostrou os seguintes resultados:

1. *Número de dentes dos pentes* (TABELAS 2 e 3).

TABELA 2

Variação do número de dentes dos pentes

n.º dentes	19 dp	20 dp	21 dp	22 dp	23 dp	24 dp
n	1	2	19	53	24	1
%	1,0	2,0	19,0	53,0	24,0	1,0
Ic	0,03 5,40	0,20 7,00	11,80 28,10	42,80 63,10	16,00 33,60	0,03 5,40

Os dados das Tabelas 2 e 3 mostram sobreposição entre os intervalos de confiança obtidos para as diferentes porcentagens de freqüência, impedindo a determinação de um número-tipo e de uma fórmula global típica para os dentes pectíneos. Embora esses valores típicos existam, sua caracterização só será possível através da análise de uma amostra bem superior à disponível.

2. *Número de séries de grânulos do gume do dedo móvel dos palpos:*

n.º de séries	n.º de exemplares
13-16	1
14-16	1
15-16	3
16-15	3
16-16	41
16-17	1
17-16	1

3. *Número de grânulos espiniformes sobre as cristas dorsais dos segmentos caudais III e IV:*

segmento III

grânulos	exemplares
1-1	2
1-2	1
2-2	44
2-3	1
3-3	3

segmento IV

grânulos	exemplares
1-2	1
2-2	6
2-3	4
2-4	1
3-3	27
3-4	5
3-5	1
4-4	5
4-5	1

TABELA 3 — Variação da fórmula global do número de dentes dos pentes

Fg.	19-20	21-20	21-21	21-22	22-21	22-22	21-23	22-23	23-22	23-23	24-23
n.º total	39 dp	41 dp	42 dp	43 dp		44 dp		45 dp		46 dp	47 dp
				4	3	16	1	5	9		
n	1	1	5	7		17		14		4	1
%	2,0	2,0	10,0	14,0		34,0		28,0		8,0	2,0
Ic	0,05	0,05	3,30	5,80		21,20		16,20		2,20	0,05
	10,70	10,70	21,80	28,80		48,70		42,50		19,20	10,70

Abreviações: *dp* = dente pectíneo; *n* = n.º de casos observados; % = porcentagem determinada pela razão n/N onde N = n.º total de casos observados; *Ic* = intervalo de confiança correspondente a uma porcentagem de freqüência com 95% de segurança; *Fg* = fórmula global

4. *Número de cristas do segmento caudal III:*

cristas	exemplares
8	48
10	3

5. *Número de olhos laterais:*

olhos	exemplares
0-3	1
2-3	1
3-3	49

DISCUSSÃO

Para o caráter *número de dentes dos pentes* foi encontrada uma variabilidade de 19 a 24 dentes, sendo que o valor mais constante foi 22 para o número de dentes e 22-22 para a fórmula global. Isto coincide com o que foi citado por Lutz e Mello (1922) na descrição original e por Pessôa (1935), que encontrou 22 dentes pectíneos em 7 dos 23 exemplares por ele estudados.

Quanto ao número de séries de grânulos do gume do dedo móvel dos palpos o valor mais encontrado foi 16-16, obtido em 41 dos 51 exemplares analisados. Lutz e Mello (1922) citam 14 séries e Pessôa (1935), 15 séries como número mais constante para esse caráter. A divergência dos resultados deve ser decorrente da diferença das amostragens.

Com referência ao número de grânulos espiniformes dos segmentos caudais III e IV os valores mais constantes obtidos foram 2-2 para o segmento III e 3-3 para o segmento IV. Esses resultados são concordantes com os de Pessôa (1935), que em seu estudo estatístico encontrou os valores 2-2 e 3-3 para os segmentos III e IV em 21 dos 40 exemplares por ele analisados.

Em populações de *Tityus* freqüentemente ocorre variação do número de cristas do segmento caudal III. A variação do número de olhos laterais é mais rara e decorrente de fenômenos teratológicos. Esses dois fatos já haviam sido anteriormente constatados por um de nós (WRL) para *Tityus trivittatus fasciolatus* (Lourenço, 1978) e são agora ratificados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a M. Gaillard e J. Rebière pela realização dos desenhos e das fotos.

RESUMÉ: Un néotype est proposé pour *Tityus serrulatus* Lutz et Mello, 1922, scorpion décrit de Belo Horizonte dans l'Etat de Minas Gerais. Nos tentatives pour retrouver le type, à l'origine déposé à l'Institut Ezequiel Dias à Belo Horizonte, se sont averées inutiles, ce qui nous amène à croire qu'il est définitivement perdu. Le néotype proposé dans la presente note sera déposé dans la collection de l'Institut Butantan à São Paulo; il présent tous les critères requis par l'article 75 du Code International de Nomenclature Zoologique.

UNITERMS: *Tityus serrulatus* Lutz et Mello, 1922; Buthidae; néotype.

LOURENÇO, W. R. & EICKSTEDT, V. R. D. von. A propósito na indicação de um neótipo para *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922 (Scorpiones; Buthidae). *Mem. Inst. Butantan* *44/45*:181-190, 1980/81.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LAMOTTE, M. *Initiation aux méthodes statistiques en biologie.* Paris, Masson et Cie. Edit., 1971. 2è edit., 144 p.
2. LOURENÇO, W.R. Etude sur les Scorpions appartenant au "complexe" *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 et, en particulier, de la sous-espèce *Tityus trivittatus fasciolatus* Pessôa, 1935. (Buthidae). Tese de doutoramento, Universidade de Paris VI, 1978. 128 p., 55 pl.
3. LUTZ, A. & MELLO, O. Cinco novos escorpiões dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. *Folha méd.*, *3*(4):25-26, 1922.
4. MATTHIESEN, F.A. Parthenogenesis in Scorpions. *Evolution*, *16*(2): 255-256, 1962.
5. MELLO-CAMPOS, O. Os escorpiões brasileiros. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, *17*(2):237-303, 1924.
6. MELLO-LEITÃO, C. Revisão do gênero *Tityus*. *Physis*, *17*:57-76, 1939.
7. MELLO-LEITÃO, C. Escorpiões sul-americanos. *Arq. Mus. nac.* (Rio de Janeiro), *40*:1-468, 1945.
8. PESSÔA, S.B. Nota sobre alguns escorpiões dos gêneros *Tityus* e *Bothriurus*. *An. paul. Med. Cir.*, *29*(5):429-436, 1935.
9. SAN MARTIN, P.R. & GAMBARDELLA, L.A. Nueva comprobación de la partenogénesis in *Tityus serrulatus* Lutz e Mello-Campos, 1922 (Scorpionida, Buthidae). *Rev. Soc. ent. arg.*, *28*(1/4):79-84, 1966.
10. VACHON, M. Etudes sur les Scorpions. *Inst. Pasteur Algérie* : 1-482, 1952.
11. VACHON, M. De l'utilité, en systématique, d'une nomenclature des dents des chélicères chez les Scorpions. *Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris*, 2è sér., *35*(2):161-166, 1963.
12. VELLARD, J. *Scorpions. In: Mission scientifique au Goyaz et au Rio Araguaya. Mém. Soc. zool. France*, *29*(6):539-556, 1932.

Mem. Inst. Butantan
44/45:191-211, 1980/81

PRODUTOS NATURAIS BIOLOGICAMENTE ATIVOS DE ANIMAIS MARINHOS. COMUNICAÇÃO QUÍMICA E ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

José Carlos de FREITAS *

RESUMO: O autor faz uma revisão sobre biotoxinas de moluscos gastrópodes e equinodermos, enfatizando novas estruturas de compostos orgânicos isolados destes animais e ações farmacológicas. A importância das biotoxinas nas comunidades foi ressaltada, bem como as espécies investigadas que também ocorrem no litoral brasileiro.

PALAVRAS-CHAVE: Biotoxinas marinhas (*), Moluscos gastrópodes (*), Equinodermos (*). Aspectos farmacológicos, Ecologia química, Defesa química.

INTRODUÇÃO

Geralmente os invertebrados pequenos e de corpo mole, como esponjas e tunicados de regiões coralígenas, apresentam hábitos crípticos e, quando eventualmente expostos, servem de alimento para peixes predadores. Certas espécies, entretanto, de esponjas, holotúrias e moluscos possuem biotoxinas que propiciam defesa química, retardando ou impedindo a predação, podendo, assim, tais espécies viver expostas a esses peixes. A competição entre predadores, bem como a presença de biotoxinas nas presas operando como mecanismos de defesa, criam pressões seletivas que conduzem as espécies predadoras, em muitos casos, a explorar novas fontes de energia e a adquirir hábitos alimentares mais especializados (BAKUS, 1969, 1971; GREEN, 1977). De acordo com BAKUS (1981), 73% de todos os invertebrados (4 filos e 42 espécies examinadas), que vivem expostos na área de estudo no Great Barrier Reef, na Austrália, foram tóxicos para peixes. Dentre os invertebrados da criptofauna, apenas 25% revelaram-se tóxicos para os peixes.

Os produtos bioativos de um organismo podem provir de fontes exógenas, ou se originar endogenamente à custa de suas próprias vias

* Instituto de Biociências da USP & Centro de Biologia Marinha da USP.

metabólicas. Na defesa química, estes produtos podem agir de várias maneiras: provocar irritação das membranas quimiorreceptoras de órgãos sensoriais dos predadores (odores crípticos); conferir à presa um sabor desagradável; afastar predadores, quando liberados na água ou, ainda, podem ser injetados através de estruturas inoculadoras. Assim, sob o aspecto ecológico, as biotoxinas são agentes que diminuem o fluxo energético nas redes tróficas dos ecossistemas.

Os animais que serão abordados no presente artigo, pertencem aos seguintes grupos: moluscos gastrópodes e equinodermes.

MOLUSCOS GASTRÓPODES

WHITTAKER (1960) relacionou as seguintes famílias de moluscos gastrópodes que estavam sendo pesquisadas com referência à presença de compostos bioativos: Muricidae, Thaididae, Buccinidae, Turbinelidae, Littorinidae, Cerithiidae e Turritellidae. Nas quatro últimas famílias, não se demonstrou a ocorrência de colinésteres, entretanto, a urocanilcolina (I) (WHITTAKER, 1960) foi encontrada nas glândulas hipobranquiais dos seguintes muricídeos e taídideos: *Murex trunculus; M. brandaris; M. fulvescens, Urosalpinx cinereus* e *Thais lapillus;* a senecioilcolina (II) (ERSPAMER e BENNATI, 1953) foi registrada em *Thais floridana* e a acrililcolina (III) (WHITTAKER, 1960) no buccinídeo, *Buccinum undatum.*

Os gastrópodes das famílias Muricidae e Thaididae perfuram estruturas calcárias, carapaça de *bivalves* e cracas, para atingirem as partes moles do corpo de suas presas. A secreção de *Murex* é inicialmente incolor ou amarelo-pálido, contendo, além disso, um cromogênio fotolábil, que se torna violeta brilhante quando exposto à luz solar. Esse cromogênio é produzido por células da região mediana da glâdula hipobranquial, a qual também secreta muco e colinésteres. A secreção tem um odor desagradável devido ao seu conteúdo em mercaptanas, provavelmente liberadas no decurso da produção do cromogênio (GARDINER, 1972). Segundo este autor, as substâncias complexas secretadas pela glândula hipobranquial possuem ação relaxante, quando atingem o interior da carapaça de suas presas. Este fato concorda com as observações de que a murexina (= urocanilcolina) é capaz de paralisar a musculatura esquelética, tanto de vertebrados como de invertebrados e que o bloqueio neuromuscular é devido à ação despolarizante na região da placa motora terminal (ERSPAMER & GLASSER, 1967; QUILLIAM, 1957, KEYL & WHITTAKER, 1958).

Entre os Taidídeos, na espécie *Thais haemastoma,* foi encontrado um novo colinéster, a dihidromurexina (Imidazole-propionilcolina) (IV) (ROSEGHINI, 1971). Mais tarde, ROSEGHINI & FICHMANN (1973) trabalhando com *Thais haemastoma,* da costa brasileira, e *Thais haemastoma floridana,* das costa do Lacio, Itália, encontraram, predominantemente, di-hidromurexina e senecioilcolina, além de pequena quantidade de urocanilcolina, que, ocasionalmente, pode estar ausente.

FREITAS, J. C. Produtos naturais biologicamente ativos de animais marinhos. Comunicação química e aspectos farmacológicos. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:191-211, 1980/81.

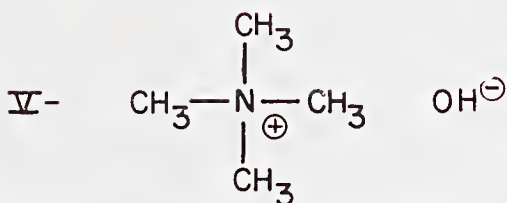
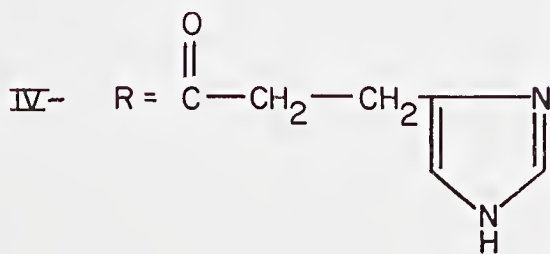
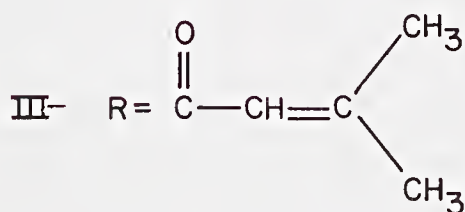
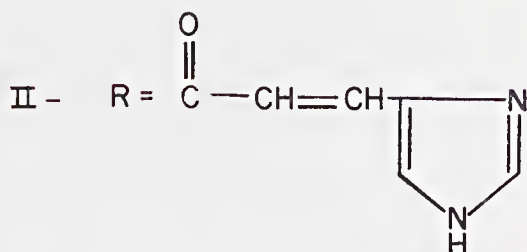
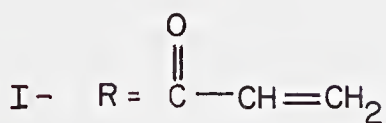
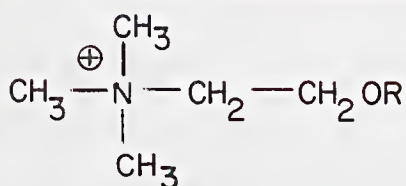
$$CH_3-\overset{\oplus}{N}(CH_3)_2-CH_2-CH_2OR$$

I - R = $\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH=CH_2$

II - R = $\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH=CH-$ (imidazol-4-il, N / N-H)

III - R = $\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH=C(CH_3)_2$

IV - R = $\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-CH_2-$ (imidazol-4-il, N / N-H)

V - $CH_3-\overset{\oplus}{N}(CH_3)_2-CH_3 \quad OH^{\ominus}$

As reações de fuga do molusco *Melagraphia aethiops* na presença do taidídeo *Haustrum haustorum* são devidos à urocanilcolina, que se origina na glândula hipobranquial do predador (LAURENSON, 1970). Neste caso, a substância comporta-se como um cairomônio, conferindo vantagem para a presa.

A glândula hipobranquial não possui órgão inoculador e seus produtos são lançados na água circundante. Como os animais portadores desta glândula são carnívoros predadores, capazes de perfurar e abrir carapaças de bivalves e cracas, GUNTER (1968) suspeita que as presas sejam envenenadas pela injeção de um fluido proveniente da glândula salivar. ENDEAN (1972) encontrou tetramina (V) nas glândulas salivares de algumas espécies de Buccinidae e Cymatiidae. HUANG e MIR (1972), trabalhando com glândulas salivares de *Thais haemastoma*, registraram uma substância tóxica para camundongos (LD_{50} = 43 mg/Kg), a qual tinha uma ação depressora no sistema nervoso central destes animais, uma forte ação hipotensora em gatos e era capaz de induzir intensa contração do íleo de cobaia e duodeno de coelho, não sendo antagonizada pela atropina ou hexametônio. Entretanto, desconhecem-se ainda as ações dessa substância sobre as presas destes moluscos carnívoros.

Dentre as presas dos moluscos gastrópodes destacam-se os equinoides, sendo que alguns grandes predadores pertencem ao gênero *Cassis* (SCHROEDES, 1962). CORNMAN (1963) demonstrou que materiais tóxicos da saliva de *Cassis tuberosa* são capazes de imobilizar os órgãos superficiais do ouriço *Diadema antillarum*, diminuindo, por exemplo, a mobilidade e a eficiência de seus espinhos; o princípio ativo é produzido em pares de grandes glândulas salivares, mas a natureza química do princípio ativo é ainda desconhecida. A espécie *Phalium granulatum*, da mesma família (Cassidae), do litoral de São Paulo, é capaz de predar ouriços *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter* e *Arbacia lixula*, segundo observações em aquários. O predador, ao perceber a presença do ouriço, desloca-se em sua direção, libera um fluido leitoso que induz resposta de fuga, que todavia, não impede que ele alcance a presa e a devore. *P. granulatum* é capaz de atingir os órgãos internos do ouriço utilizando sua probóscide, que perfura o perístoma ou a carapaça (Fig. 1). As possíveis biotoxinas presentes em P. *granulatum* serão objeto de pesquisas futuras.

A família Conidae também possui representantes na costa brasileira; entretanto, as nossas espécies habitam o sublitoral, distribuindo-se entre os 25 m e 165 m e têm sido coletadas somente por dragagens (RIOS, 1975). Quase tudo que se conhece sobre o comportamento predatório desta família de gastrópodes peçonhentos provém de estudo de espécies dos recifes de corais da região Indo-Pacífica, onde são abundantes. (KöHN *et al*, 1960). KöHN (1959) assinalou que os conídeos são predadores de poliquetos, moluscos ou peixes e que a peçonha de algumas espécies piscívoras ocasionalmente pode atingir o homem. O aparelho glandular consiste de um bulbo muscular, o qual armazena a peçonha secretada pelo longo duto peçonhento; a estrutura inoculadora consiste de um saco radular, contendo dentes em arpão, sendo que chegam atingir um comprimento de até 10,8mm, podendo variar na forma e no tamanho,

FREITAS, J. C. Produtos naturais biologicamente ativos de animais marinhos. Comunicação química e aspectos farmacológicos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:191-211, 1980/81.

Fig. 1 — Carapaça de *Lytechinus variegatus* perfurada por *Phalium granulatum*. Escala = 1 cm.

dependendo da espécie. A contração da espessa musculatura do bulbo muscular resulta na expulsão da peçonha através do lúmen do duto peçonhento em direção à faringe. Daí passa para uma abertura na base de um dente radular oco, enchendo-o. Esse dente é deslocado para a pré-faringe no momento do ataque à presa. Uma abertura próxima à extremidade ponteaguda do dente permite a injeção da peçonha no corpo da presa, à maneira de uma agulha hipodérmica. Dentes radulares adicionais são produzidos e armazenados no saco radular. A principal ação da peçonha dá-se no sistema neuromuscular, embora os autores não excluam a possibilidade de que exista uma ação no sistema nervoso central; ela contém compostos de amônio quaternário (N-metilperidina, gama-butirobetaína, homarina) e derivados indóies (KöHN *et al.*, 1960).

Um outro gastrópode, *Babylonia japonica,* é portador da surugatoxina (VI). A biotoxina recebeu este nome por ter ocorrido o primeiro registro de intoxicação humana na baía de Suruga (Japão). O isolamento e a determinação estrutural da substância devem-se a Kosuge *et al* (1972) ; trata-se de uma molécula singular por reunir as estruturas de um indol, uma pteridina e um mioinositol (HABERMEHL, 1976). Farmacologicamente, é dotada de uma potente ação bloqueadora ganglionar, cerca de 12 vezes maior que a do cloreto de tetraetilamonio (FUHRMAN, 1980).

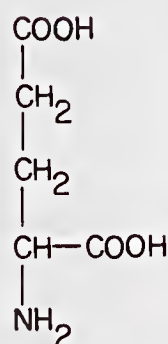
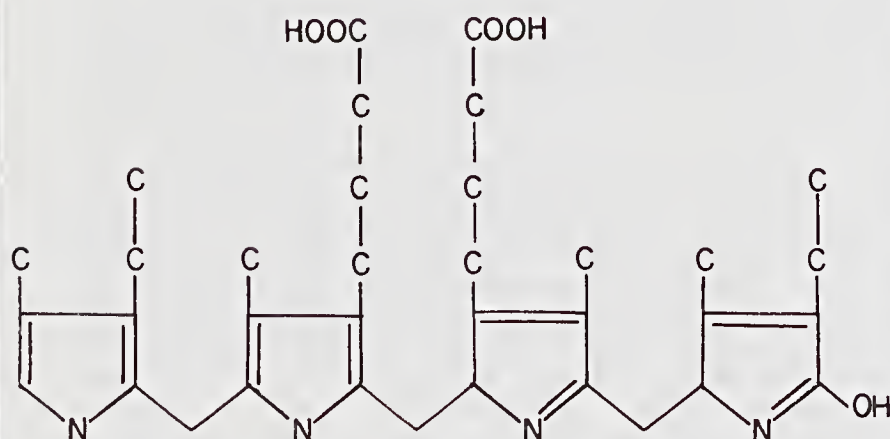
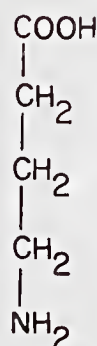
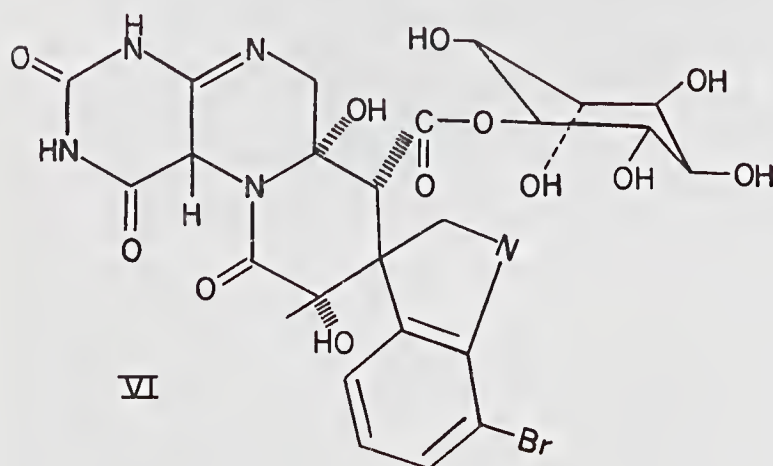
Um interessante aspecto da comunicação química entre algas vermelhas incrustantes e larvas do molusco "abalone" *(Haliotis rufescens)* foi estudado por MORSE *et al.* (1979). As larvas livre-natantes exibem um comportamento de ocupação do substrato em resposta à presença

de algas rodofíceas incrustantes. Os autores concluíram que o ácido aminobutírico (GABA) (VII), um neurotransmissor encontrado em muitos animais, é um potente indutor de recrutamento e metamorfose das larvas do molusco. GABA é encontrado em altas concentrações nos extratos das algas vermelhas de recifes de corais juntamente com o pigmento ficoeritrobilina (composto tetrapirrólico linear) (VIII) e seu derivado protéico ficoeritrina. Estes pigmentos contêm nos anéis, imino-cíclicos análogos do GABA, e são também potentes indutores de recrutamento. L-glutamato (IX), mesmo em altas concentrações foi fracamente ativo no que se refere a esse recrutamento das larvas do *H. rufescens*.

VI

VII

VIII

IX

No grupo dos gastrópodes opistobrânquios encontram-se glândulas epidérmicas ou subepidérmicas, unicelulares ou pluricelulares, que secretam muco abundante ou fluidos ácidos, sendo rejeitados pela maioria dos peixes (THOMPSON, 1960). Nos opistobrânquios nudibrânquios sacoglossos (doridáceos e eolidáceos), as glândulas defensivas estão situadas nas papilas dorsais que podem sofrer autotomia. Em espécies, como por exemplo, *Discodoris sp.*, muitas glândulas defensivas estão situadas na borda do manto e podem liberar fragmentos por autotomia. Estes animais são em geral aposemáticos, sendo as cores crípticas para alguns substratos (ROS, 1976).

Eolidáceos e alguns dendronotáceos nutrem-se de cnidários, acumulando os nematocistos de suas presas, em cnido-sacos das papilas dorsais (= ceratas), os quais recebem o nome de cleptocnidas. Parece que o muco, produzido naquelas glândulas do manto impede o disparo dos nematocistos, como no caso do peixe-palhaço, *Amphiprion sp*, e de outros comensais de anêmonas que passam incólumes tocando os tentáculos de seu hospedeiro (ROS, 1976). Os cnido-sacos libertam os nematocistos através dos poros das referidas papilas dorsais por pressões mecânicas das musculatura circular ou por lesão provocada por predadores. No caso do gastrópode planctônico *Janthina sp*, que preda o hidrozoário *Velella sp*, a secreção púrpura da glândula hipobranquial parece impedir a descarga dos nematocistos (GARDINER, 1972). Nesse molusco, bem como no opistobrânquio planctônico *Glaucus atlanticus*, que foi observado predando *Physalia sp* ("caravela") (Fig. 2), no litoral de São Paulo, os nematocistos também são transportados para os cnido-sacos e passam a ser utilizados para defesa, existindo registros de que podem afetar o homem (THOMPSON & BENNETT, 1969, 1970).

O nudibrânquio doridáceo *Phyllidia varicosa* secreta um muco odorífero, tóxico para outros animais marinhos, cuja substância ativa é um sesquiterpenóide isocianeto (9-isocianopupuqueanano), (X) que também foi isolado da esponja *Hymeniacidon sp*, da qual este molusco se alimenta (BURRESON *et al.* 1975).

Extratos aquosos totais de nudibrânquios doridáceos (*Anisodores nobilis* e *Doriopsilla albopunctata* ou das suas glândulas digestivas excisadas, foram letais quando injetados em caranguejos ou em camundongos (intraperitonialmente) e induziram bradicardia e hipotensão em camundongos e ratos. Em corações isolados de cobaias mostraram ações inotrópicas e cronotrópicas negativas (FUHRMANN *et al.* 1979).

Ainda, de acordo com FUHRMANN (1980), a substância responsável por estas ações farmacológicas, a doridosina (XI), foi isolada também da esponja *Tedania sp* pelo grupo de Pesquisas Roche, que lhe atribuíram, ainda, propriedades mio-relaxantes, antiinflamatórias e antialérgicas.

Investigações com o opistobrânquio *Peltodoris atromaculata* e sua presa, a esponja *Petrosia ficiformis*, resultaram no isolamento de vários compostos acetilênicos de alto peso molecular ($R - C \equiv H$) e estes metabólitos secundários constituem uma boa ferramenta para análise das interações presa-predador (CIMINO *et al.* 1980).

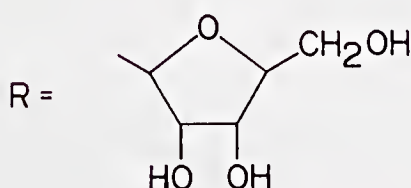
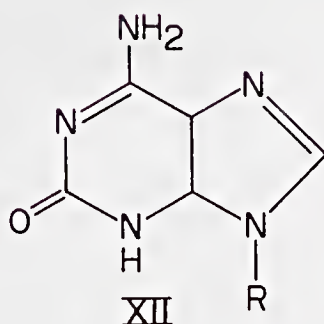
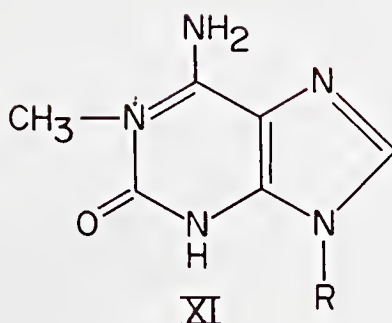
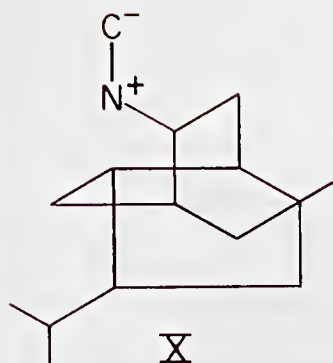
Fig. 2 — *Physalia* sp e seu predador, o molusco planctônico *Glaucus atlanticus*. Escala = 2 cm.

O isoguanosídeo (XII), conhecido na natureza somente de uma espécie vegetal ("croton bean"), foi recentemente isolado de um animal marinho, o nudibrânquio do Oceano Pacífico, *Diaulula sandieguensis* (FUHRMANN *et al.* 1981). Nos mamíferos, esta substância provoca bradicardia, hipotensão e relaxamento da musculatura lisa. Os autores não detectaram o isoguanosídeo na esponja, *Haliclona permollis*, que é predada pelo nodibrânquio.

X

XI

XII

R =

Stylocheilus longicauda, um opistobrânquio que também é encontrado na costa brasileira, adquire a debromoaplisiatoxina (XIII) das algas azuis de que se alimenta. A substância possui atividade antileucêmica em camundongos e dermonecrótica (MYNDERSE *et al.* 1977).

Um outro opistobrânquio, *Bulla striata*, dotado de concha relativamente bem desenvolvida e que pode ser encontrado em praias lodosas no litoral de São Paulo, libera uma secreção que escurece a água em sua proximidade (TCHANG-SI, 1931). Não se sabe se esta secreção provoca mascaramento visual ou funciona como desorientador olfativo ("odor críptico").

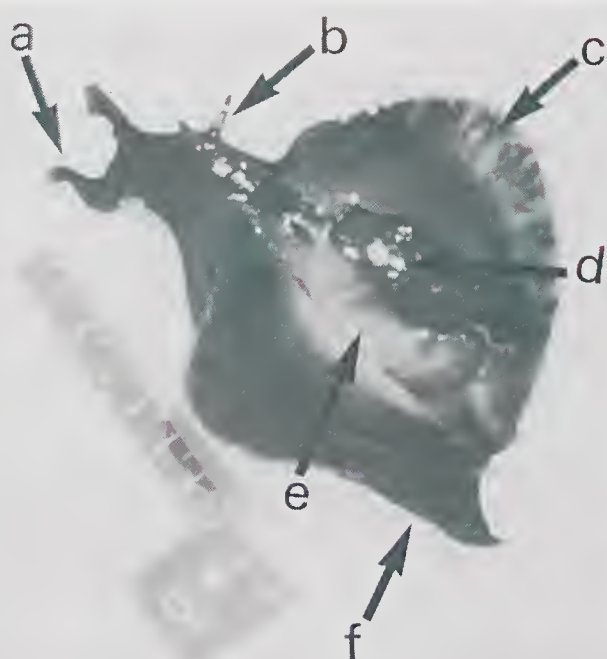



Fig. 3 — Exemplar jovem de *Aplysia brasiliana* — a) tentáculos orais; b) rinóforos; c) parapódios; d) manto envolvendo a concha; e) glândula digestiva da massa visceral, vista por transparência; f) pé.

Em relação aos opistobrânquios da família Aplysiidae, o autor fez uma revisão da literatura sobre defesa química e realizou estudos a respeito das glândulas defensivas de *Aplysia brasiliana* (FREITAS, 1977, 1980), espécie freqüente no litoral brasileiro (Fig. 3). SCHMITZ (1980) apresentou uma comunicação no III Simpósio Internacional sobre Produtos Naturais Marinhos, realizado em Bruxelas (Bélgica), enfatizando que *Aplysia dactylomela* acumula um terpeno bromado originário das algas de que se alimenta, o dactiline (XIV), que é capaz de potencializar os efeitos do pentobarbital nos camundongos, por inibição do metabolismo da droga. Dentre os membros desta família, *Aplysia californica* tem sido a espécie mais estudada do ponto de vista da ecologia química e do comportamento defensivo (FLURY, 1915; WINKLER, 1961; WINKLER *et al.* 1962; WINKLER e TILTON, 1962; WINKLER, 1969; STALLARD & FAULKNER, 1974), seu sistema nervoso possui neurônios gigantes que constituem excelentes ferramentas para o estudo analítico da neurofisiologia a nível celular, pois tais cédulas são identificáveis nos mapeamentos ganglionares publicados por KANDEL (1976). Assim,

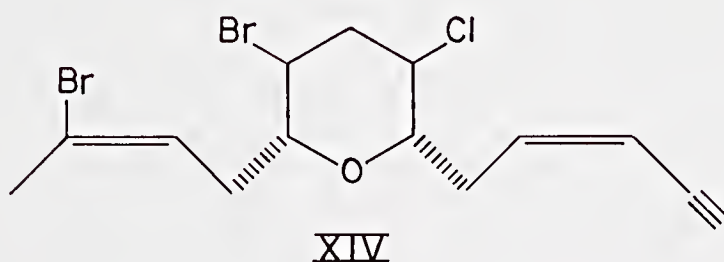
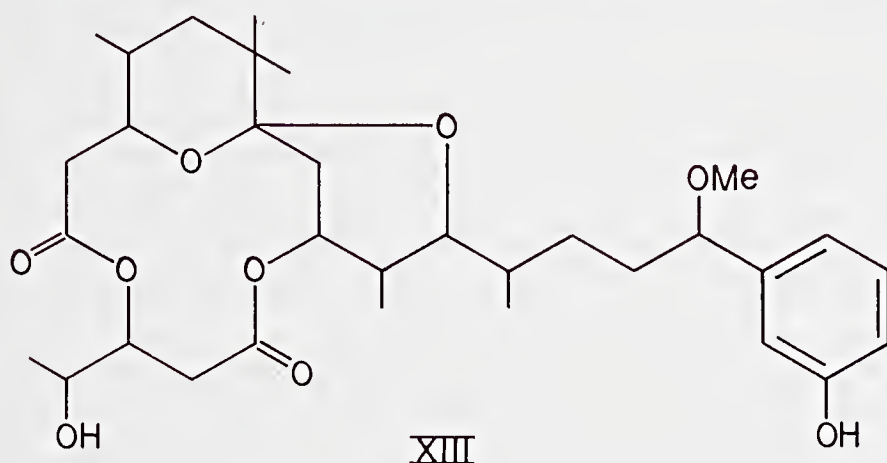
o gânglio abdominal de *Aplysia* vem sendo considerado como um sistema experimental para a investigação do papel de peptídeos como mensageiros químicos no sistema nervoso (BROWNELL & MAYERI, 1979).

OMe

OH OH

XIII

Br Br Cl

XIV

Da glândula digestiva e intestino de *Notarchus leachi* (= *Bursatella leachi*), ELSWORTH (1980), isolou a notartoxina, que possui um LD_{50} de ordem de 4 ng por camundongo.

EQUINODERMES

Dentre os invertebrados deuterostômios, os equinodermes constituem o maior grupo, com aproximadamente 6.000 espécies englobando cinco classes com vários representantes registrados na literatura como venenosos ou peçonhentos (RUSSELL, 1965).

A espécie *Ophiocomina nigra*, representante da classe Ophiuroidea, possui grande quantidade de glândulas pluricelulares na superfície aboral e lateral do corpo, que secretam mucopolissacarídeos ácidos, cujo pH se

aproxima de 1,0, servindo como defensivo para peixes e outros animais marinhos predadores (FONTAINE, 1964).

Na classe Asteroidea, os estudos de HASHIMOTO & YASUMOTO (1960) com a espécie *Asterina pectinifera* levaram à descoberta de uma substância solúvel em água e em álcool diluído e insolúvel em benzeno, clorofórmio e éter, que apresentou reações positivas para esteróis e açúcares. Através de análises cromatográficas os autores concluíram que a substância é uma saponina. Segundo MACKIE *et al.* (1977), os equinodermes são os únicos dentre os animais marinhos que apresentam saponinas esteroídicas tóxicas, conhecidas como asterosaponinas e holoturinas, assim denominadas, porque estão presentes em grandes quantidades em asteróides e holoturóides, respectivamente. As asterosaponinas são triterpenos característicamente derivados da ciclização de múltiplas subunidades de isopreno. Incluídos neste grupo de substâncias estão o colesterol e seus derivados, além dos glicosídeos cardiotônicos de origem vegetal. As atividades biológicas destes compostos são as mais diversas e eles são freqüentemente ativos em concentrações muito baixas. As saponinas representam um derivado terpênico que é caracterizado pela posse de uma cadeia linear de monossacarídeos na posição C-3 do esqueleto esteroídico típico (XV). Este pormenor propicia um alto grau de solubilidade na água, servindo para o bom desempenho de seu papel biológico no ambiente aquático marinho. O estágio inicial para a identificação de uma saponina se resume na quebra da ligação glicosídica e análises por métodos convencionais de cromatografia (PATTERSON *et al.* 1978).

O conteúdo em asterosaponinas dos pés ambulacrários de certas estrelas do mar (*Asterias rubens* e *Marthasterias alacialis*) induz respostas de fuga em suas presas (MACKIE *et al.* 1968) e este mesmo comportamento foi observado no molusco *Malagraphia aetiops*, na presença da estrela do mar predadora *Coscinasterias calamaris* (LAURENSON, 1970). Agentes tensioativos sintéticos são capazes de induzir respostas de escape em animais que naturalmente respondem às saponinas de *Marthasterias glacialis*, indicando que a atividade surfactante das saponinas constitui o fator importante na estimulação (MACKIE *et al.* 1968; MACKIE, 1970; 1975).

O quimiotactismo responsável pela associação do poliqueto *Arctonoë fragilis* com a estrela do mar hospedeira, *Evasterias troschelli* depende do conteúdo em asterosaponinas, as quais impedem que a outra espécie aparentada, *Arctonoë pulchra* se associe àquela estrela. Este último poliqueto morre quando permanece por mais de 150 minutos exposto às saponinas (PATTERSON *et al*, *op. cit.*).

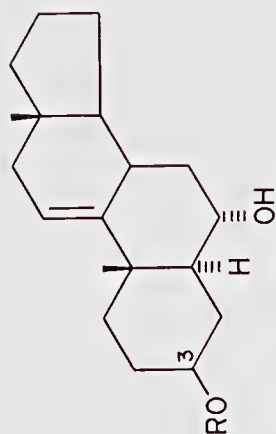
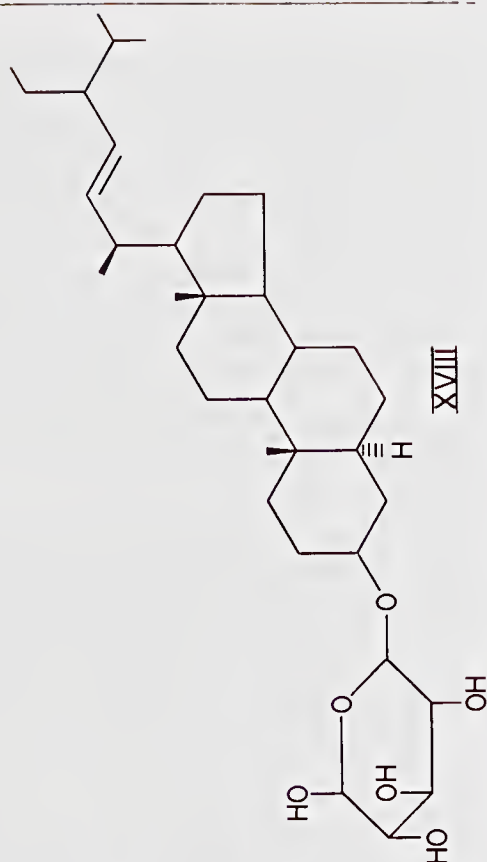
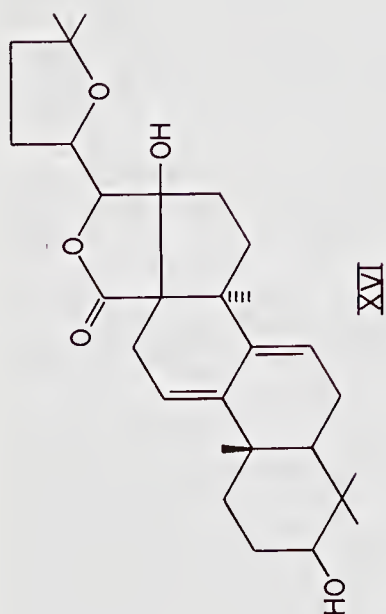
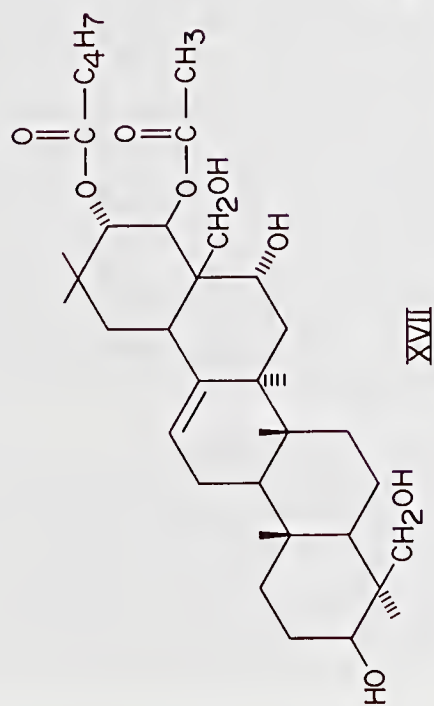
Quanto às atividades farmacológicas, as asterosaponinas causam bloqueio irreversível da junção neuromuscular em preparações freno-diagragmáticas (FRIESS, 1972). As saponinas de *Marthasterias glacialis* são ictiotóxicas, além de hemolíticas para mamíferos e peixes (MACKIE *et al.* 1975). Extratos crus de *Asterias forbesi*, *Acanthaster planci* e *Asterina pectinifera* são antivirais no caso de influenza das aves (vírus B) (RUGGIERI, 1976) e a atividade citotóxica foi recentemente estudada sobre zigotos do ouriço do mar (ANISIMOV *et al.* 1980).

Novas asterosaponinas foram isoladas de *Astropecten aurantiacus* e *M. glacialis* por SIMONE *et al.* (1979) ; *Lynckia guildingi,* KAPUSTINA *et al.* (1978), e de *Echinaster sepositus,* por SIMONE *et al.* (1980). De acordo com RICCIO *et al.* 1980, esta última espécie possui um arranjo cem ser característicos do gênero *Echinaster,* tendo sido também isolado molecular único, ou seja, glicosídeos cíclicos esteroídicos, os quais pare- da espécie *Echinaster lozonicus.*

O sulfato de colesterol está presente a uma concentração de 1,3 mg/g de tecido seco de *Asterias rubens* (BJORKMAN *et al.* 1972). Mais tarde verificou-se que este composto também estava presente em todas as outras classes dos equinodermes (GOAD, 1976).

Vários fosfágenos já foram isolados de asteróides (THOAI & ROCHE, 1960) e a homarina (ácido N-metil-picolínico), foi detectada em asteróides, holoturóides e em certos equinóides por HOPPE-SEYLER (1933).

Focalizando os equinodermes da classe Holothuróidea, FREY (1951) registrou que os habitantes da costa Pacífica empregavam sucos de pepinos-do-mar para envenenar peixes nas poças de marés dos recifes de corais. CHANLEY *et al.* (1959), investigando a espécie *Actinopyga agassizi,* isolaram a saponina esteroídica, holoturina, que por hidrólise forneceu os seguintes açúcares: D-glicose, D-xilose, quinovose e 3-0-metil-glicose. Posteriormente, a holoturina B foi isolada de *Holothuria vagabunda* e *H. lubrica* por YASUMOTO *et al.* (1967), que obtiveram por hidrólise apenas D-quinovose e D-xilose. Os aglicones esteróidicos (XVI) foram designados holoturinogeninas por CHANLEY *et al.* (1966). As holoturinas são tóxicas para peixes e alguns invertebrados em doses inferiores a 2ppm, provocam hemólise e têm ação antitumoral (NIGRELLI & JAKOWSKA, 1960) ; induzem anormalidades no desenvolvimento de zigotos do ouriço do mar (NIGRELLI & JAKOWSKA, 1961; RUGGIERI, 1965; ANISIMOV *et al.* 1972, 1973, 1974 e 1980). Estes glicosídeos possuem uma ação citotóxica 2-3 vezes superior à da teasaponina (XVII), extraída da planta *Thea sinensis L.,* 10 vezes superior à da asterosaponina-L, isolada da estrela do mar *Lynckia guildingi* e 20-30 vezes superior à do caulosídeo extraído da planta *Caulophyllum robustum.* A atividade citotóxica destas substâncias está na dependência do número de unidades monossacarídicas ligadas ao grupo hidroxila do C_3; holoturina A possui quatro unidades monossacarídicas, enquanto que a holoturina B, somente duas, decrescendo assim a atividade citotóxica desta última substância (ANISIMOV *et al.* 1980). *Isostichopus badionotus,* que ocorre também no litoral de São Paulo, é portador de outro glicosídeo esteroídico (XVIII) (ELYAKOV *et al.* 1980).

Quanto mais tropical for a localidade estudada, maior a probabilidade dos holoturóides serem tóxicos para peixes; como os pepinos-do-mar se deslocam vagarosamente, o desenvolvimento de mecanismos de defesa química nos trópicos, é vantajoso, uma vez que seus predadores potenciais são animais relativamente rápidos (BAKUS, 1974). Dependendo da espécie, a biotoxina pode estar presente na parede do corpo, parede do corpo e vísceras, ou na parede do corpo, vísceras e tubos de Cuvier. BAKUS (*op. cit.*) atribuiu a Tursch (dados não-publicados) a informação de que

XVI
XVIII
XV - R = MONOSSACARÍDEOS
XVII

em alguns casos dois tipos de holoturinas podem ocorrer num mesmo holoturóide. Os túbulos de Cuvier estão presentes somente em algumas espécies e se originam de um ramo comum da árvore respiratória. Quando atacados os holoturóides lançam os túbulos através do ânus, por pressão hidrostática da cavidade perivisceral, os quais se espalham sobre o predador.

Recentemente novas holoturinas vêm sendo isoladas e sua atividade citotóxica está sendo testada em zigotos do ouriço do mar (GARNEAU *et al.* 1980). São conhecidos métodos de síntese destas substâncias, a partir do lanosterol (HABERMEHL *et al.* 1980).

Os ouriços-do-mar, pertencentes ao grupo dos equinóides regulares, apresentam uma carapaça globosa de calcita, na qual se articulam espinhos e pequenas estruturas em forma de pinça denominadas pedicelárias. Os espinhos das espécies da família Diadematidae podem exceder 30 cm de comprimento e são dotados de um canal contendo uma biotoxina que pode ser liberada por ruptura durante a penetração no tegumento de outro animals, descarregando assim, seu conteúdo na lesão (RUSSEL, 1971). As espécies, *Echinotrix calamaris* e *E. diadema*, possuem substâncias que aumentam a pressão arterial em gatos e o fracionamento por cromatografia evidenciou a noradrenalina e um fator não dialisável que excita a musculatura lisa e produz dor intensa (ALENDER, 1967). Em *Asthenosoma varium*, os espinhos menores portam terminalmente glândulas de veneno, que descarregam seu conteúdo nas lesões por eles provocadas (RUSSEL, *op. cit.*).

As pedicelárias estão distribuídas na superfície corpórea, por entre os espinhos em equinóides e também nos asteróides. De acordo com von Uexkull (1899), as pedicelárias globíferas isoladas de *Sphaerechinus granularis*, quando intactas, ao picarem reflexamente uma preparação de nervo ciático de rã, impedem a condução de impulsos. O autor demonstrou, também que o extrato de uma única pedicelária é capaz de provocar a parada do coração da rã. O simples manuseio de espécies do Indo-Pacífico (*Toxopneustes sp* e *Asthenosoma* sp) provocam tonturas e paralisias musculares (SOUTHCOTT, 1970).

LÉVY (1925) investigou os efeitos hemolíticos dos homogeneizados de pedicelárias de *Echinus esculentus* e *Paracentrotus lividus*, concluindo que a ação hemolítica é análoga àquela exercida pelas peçonhas de abelhas, serpentes, lacraias ou escorpiões. Extratos de pedicelárias globíferas de *Toxopneustes pileolus*, injetados em camundongos, induzem dificuldades respiratórias e mudanças na temperatura corpórea (FUJIWARA, 1935). Entre nós, MENDES *et al.* (1963) trabalharam com homogeneizados de pedicelárias globíferas de *Lytechinus variegatus* e detectaram uma intensa atividade colinérgica, sendo que o material ativo foi dialisável, parcialmente inativado pelo calor e totalmente por hidrólise alcalina (NaOH 0,25N). Posteriormente ALTIMARI (1969) investigou os extratos de glândulas situadas no pedúnculo e nas valvas das pedicelárias de *L. variegatus*, obtendo uma ação colinérgica mais intensa para as glândulas valvares, concordando assim com os resultados de PÉRÈS (1950) que trabalhou com extratos aquosos de pedicelárias da espécie *Sphaerechinus granularis*.

OKADA *et al.* (1950) verificou que corações de ostras submetidos à picadas de pedicelárias globíferas de *Toxopneustes pileolus*, apresentaram um aumento inicial do tônus seguido de bloqueio dos batimentos cardíacos. Trata-se de um interessante registro no campo da farmacologia comparativa.

CONCLUSÕES

As investigações sobre biotoxinas de organismos marinhos, levam à elucidação de novas estruturas químicas de metabólitos, tem o interesse prático na indústria farmacêutica e medicina e vem trazendo grandes contribuições para o melhor entendimento da estrutura e função dos organismos nas comunidades. Neste contexto, BAKUS (1981) indicou novas questões a serem solucionadas em pesquisas futuras, a saber: como certos invertebrados predadores (gastrópodes, p. ex.) podem consumir animais altamente tóxicos (esponjas, gorgônias, holotúrias etc.), sem sofrerem perturbações aparentes? Qual o possível papel das biotoxinas no impedimento da fixação de larvas sobre invertebrados sésseis? Qual o papel destes produtos no controle da estrutura da comunidade? Acredito que as pistas para a solução destas questões poderão ser encontradas com o trabalho conjunto de biólogos e químicos, como publicou BARBIER (1981)... "direct field interaction between marine chemists and naturalists or biologists who study marine phenomena is an absolute necessity".

Neste trabalho, tratou-se apenas de equinodermes e moluscos gastrópodes e, como visto, dentre as espécies pesquisadas com sucesso, algumas também ocorrem no litoral brasileiro. Entretanto, naquelas espécias cujas biotoxinas são obtidas através da dieta, os produtos detectados em outras populações podem diferir segundo a região geográfica ou até estar ausentes. A observação dos organismos na natureza, ou mesmo, em condições de aquário podem levar a novos e interessantes problemas para serem investigados no campo da ecologia química.

ABSTRACT: The author reviews the pharmacological and ecological aspects of organic compounds obtained from marine mollusc gastropods and echinoderms. A number of new structures of organic compounds are described with emphasis on those from species occurring in the Brazilian coast. Their importance are discussed in terms of community.

KEYWORDS: Marine biotoxins *, Gastropd molluscs *, Echinoderms * Farmacological aspects, Chemical ecology, Chemical defense.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Raymond Zelnik pelo convite para participação no Seminário de Produtos Naturais em comemoração ao 80.º Aniversário do Instituto Butantan e pela tarefa de revisão, ao Dr. E.G. Mendes, igualmente pela revisão crítica.

FREITAS, J. C. Produtos naturais biologicamente ativos de animais marinhos. Comunicação química e aspectos farmacológicos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:191-211, 1980/81.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALENDER, C.B. A biologically active substance from the spines of two diadematid sea-urchins. *In* Russell, F.E. & Saunders, P.R. ed. *Animal Toxins*. Oxford, Pergamon Press, 1967. p. 145-155.

2. ALTIMARI, M.I.S. *Substâncias tóxicas produzidas por Equinodermes*. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 1969. 54p.

3. ANISIMOV, M.M.; KUZNETSOVA, T.A.; PROKOFYEVA, N.G. & ELYAKOV, G. B. The toxic effect of stichoposid. A_1 from *Stichopus japonicus* Selenka on early embryogeneses of the sea urchin. *Toxicon*, *10*:187, 1972.

4. ANISIMOV, M.M.; FRONERT, E.B.; KUZNETSOVA, T.A. & ELYAKOV, G.B. The toxic effect of triterpene glycosides from *Stichopus japonicus* Selenka on early embryogenesis of the sea urchin. *Toxicon*, *11*:109, 1973.

5. ANISIMOV, M.M.; SHCHEGLOV, V.V., STONIK, V.A.; FRONERT, E.B.B. & ELYAKOV, G.B. The toxic effect of Cucumariosidae C from *Cucumaria fraudatrix* on early embryogenesis of the urchin. *Toxicon*, *12*:327, 1974.

6. ANISIMOV, M.M.; PROKOFIEVA, N.G.; KOROTIKH; L.Y.; KAPUSTINA, I.I. & STONIK, V.A. Comparative study of Cytotoxic Activity of Triterpene glycosides from Marine Organisms. *Toxicon*, *18*:221, 1980.

7. BAKUS, G.J. Energetics and Feeding in shallow marine waters. *Int. Rev. Gen. & Exper. Zool.*, *4*:275, 1969.

8. BAKUS, G.J. An ecological hypothesis for the evolution of toxicity in marine organims. *In* de Vries, A. & Kochva, E. ed. *Toxins of Animal and Plant Origin*. New York, Gordon & Breach, 1971. p. 57-61.

9. BAKUS, G.J. Toxicity in Holothurians: A Geographical Patterns. *Biotropica*, *6*(4):229, 1974.

10. BAKUS, G.J. Chemical Defense Mechanisms on the Great Barrier Reef, Australia. *Science*, *211*(4481):497, 1981.

11. BARBIER, M. Marine Chemical Ecology: Roles of Chemical Communication and Chemical Pollution. *In* SCHEUER, P.J. ed. *Marine Natural Products*, *4*. San Francisco, Acad. Press, 1981. p. 147-186.

12. BJORKMAN, L.R., KARLSSON, K.A. & NILSSON, K. On the existence of cerebroside and cholesterol sulfate in tissues of the sea star, *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *43B*:409, 1972.

13. BLANKENSHIP, J.E.; LANGLAIS, P.J. & KITTREDGE, J.S. Identification of a Cholinomimetic Compound in the Digestive Gland of *Aplysia californica*. *Comp. Biochem. Physiol.* *51C*:129, 1975.

14. BROWNELL, P. & MAYERI, E. Prolonged Inhibition of Neurons by Neuroendocrine Cells in *Alysia*. *Scienco*, *204*(4391):417, 1979.

15. BURRESON, B.J., SCHEUER, P.J.; FINER, J. & CLARDY, J. 9-isocyanopupukeanane, a marine invertebrate allomone with a new sesquiterpene skeleton. *J. Am. Chem. Soc.*, *97*:4763, 1975.

16. CHANLEY, J.D.; LEDEEN, R.; WAX, J.; NIGRELLI, R.F. & SOBOTKA, H. Holothurin I. The Isolation, Properties, and sugar components of holothurin A. *J. Am. Chem. Soc.*, *81*:5180, 1959.

17. CHANLEY, J.D.; MEZZETTI, T. & SOBOTKA, H. The holothurinogenins. *Tetrahedron*, *22*:1857, 1966.

18. CIMINO, G.; De ROSA, S.; De STEFANO, S. & SODANO, G. Novel Metabolites from some Predator-Prey Pairs. *Third International Symposium on Marine Natural Products*, Brussels, Belgium, 1980.

19. CORNMAN, I. Toxic Properties of the Saliva of *Cassis*. *Nature*, *200*:88, 1963.

20. ELSWORTH, J.F. The Chemistry of the Sea hare, *Notharchus leachi*. *Third International Symposium on Marine Natural Products*, Brussels, Belgium, 1980.

21. ELYAKOV, G.B.; KALINOVSKAYA, N.I.; STONIK, V.A. & KUZNETSOVA, T.A. Glycosides of Marine Invertebrates. VI. Steroid Glycosides from Holothurian *Stichopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *65*B:309, 1980.

22. ENDEAN, R. Aspects of Molluscan pharmacology. *In* FLOR, KIN, M. & SCHEER, N.Y. ed *Chemical Zoology*. Mollusca, *7*. New York, Academic Press, 1972. p. 421-466.

23. ERSPAMER, V. & BENNATI, O. Identification of Murexine as β-[imidazolyl--4]-acryl-choline. *Science*, *117*:161, 1953.

24. ESRPAMER, V. & GLASSER, A. The pharmacological actions of murexine (Urocanylcholine). *Brit. J. pharmacol. Chemother.*, *12*:176, 1957.

25. FLURY, F. Uber das Aplysiengift 1915. *Apud* RUSSELL, F.E. 1971.

26. FONTAINE. A.R. The integumentary mucous secretions of ophiuroid *Ophiocomina nigra*. *J. mar. Biol. Ass. U. K.*, *44*:145, 1964.

27. FREITAS, J.C. Action of Crude and Fractioned Homogenates of the Midgut Gland of the Sea Hare *Aplysia brasiliana* Rang, 1828 on some Cholinoceptive Structures. *Comp. Biochem. Physiol.*, *56*C:57-61, 1977.

28. FREITAS, J.C. Compostos Biologicamente Ativos em Invertebrados Marinhos. *Bol. Inst. oceanogr., S. Paulo*, *29*(2), 1980.

29. FREY, D.G. The use of sea cucumbers in poisoning fishes. *Copeia*, *2*:175, 1951.

30. FRIESS, S.L. Mode of action of marine saponins on neuromuscular tissues. *Fed. Proc.*, *31*(3):1146, 1972.

31. FUHRMAN, F.A.; FUHRMAN, G.J.; & DERIEMER, K. Toxicity an Pharmacology of Extracts from Dorid Nudibranchs. *Biol. Bull.*, *156*:289, 1979.

32. FUHRMAN, F.A. Recent advances in marine pharmacology. *Trends in Pharmacol. Sc.*, *1*(1):187, 1979/80.

33. FUHRMAN, F.A.; FUHRMAN, G.J.; NACHMAN, R.J. & MOSHER, H.S. Isoguanosine: Isolation from an Animal. *Science*, *212*(4494):557, 1981.

34 FUJIWARA, T. On the poisonous pedicellaria of *Toxopneustes pileolus* (Lamarck), 1935. *Apud* RUSSELL, F.E., 1971.

35. GARDINER, M.S. *The Biology of Invertebrates*. New York, McGraw-Hill, 1972. 954p.

36. GARNEAU, F.X.; APSIOM, J.W.; LARRIVÉE, D.; GIRARD, M. & SIMARD, J.L. Holothurins from the Cucumbers *Psolus fabrici* and *Cucumaria frondosa*. *Third International Symposium on Marine Products*, Brussels, Belgium, 1980.

37. GOAD, L.J. The Steroids of Marine Algae and Invertebrates Animals. *In* MALINS, D.C. & SARGENT, D.R. ed. *Biochemical Perspectives in Marine Biology*, *3*. San Francisco, Acad. Press, 1976. p. 213-318.

38. GREEN, G. Ecology of Toxicity in Marine Sponges. *Marine Biology*, *40*:207, 1977.

39. GUNTER, G. Some factors concerning the drilling apparatus and the feeding and predation of prosobranchiate gastropods, specially on other molluscs. *Proc. Symposium on Mollusca*, *1*:370, 1968.

40. HABERMEHL, G.G. Recent Progress in the Chemistry of Marine Animal Toxins. *Bull. Inst. Pasteur*, *74*:107, 1976.

41. HABERMEHL, G.G.; SEIB, K.H.; MULLER, K.D. & KIRSCH, J. Synthesis of holothurinogenines. *Third International Symposium on Marine Natural Products*. Brussels, Belgium, 1980.

42. HASHIMOTO, Y. & YASUMOTO, T. Confirmation of saponin as a toxic principle of starfish. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish*, *26*:1132, 1960.

43. HOPPE-SEYLER, F.A. Über das Homarin, eine bisher unbekannte Tierische Base, 1933. Apud RUSSELL, F. E. 1971.

44. HUANG, C.L. & MIR, G.N., Pharmacological investigation of salivary gland of *Thais haemastoma* (Clench). *Toxicon*, *10*:111, 1972.

45. KANDEL, E.R. *Celular Basis of Behaviour. An introduction to behavioral neurobiology*. San Francisco, W.H. Freeman, 1976. 727p.

46. KAPUSTINA, I.I.; LEVINA, E.V. & ATONIK, V.A. Asterosaponin from the starfish *Linckia guildingi*, 1978. *Apud* ANISIMOV *et al*, 1980.

47. KEYL, M.J. & WHITTAKER, V.P. Some pharmacological properties of murexine (urocanylcholine). *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, *13*:103, 1958.

48. KÖHN, A.J. The ecology of *conus* in Hawaii. *Ecol. Monogr.* *29*:47, 1959.

49. KÖHN, A.J.; SAUNDERS, P.R.; WIENER, S. Preliminary studies on the venon of the marine snail *Conus*. *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, *90*:706, 1960.

50. KOSUGE, T.; ZENDA, H.; OCHIAI, A.; MASAKI, N.; NOGUKI, M.; KIMURA, S. & NARITA, H. Isolation and structure determination of a new marine toxin, surugatoxin from the japanese ivory shell, *Babylonia japonica*, 1972. *Apud* HABERMEHL, G.G., 1976.

51. LAURENSON, D.F. *Ph. D. Thesis, University of Auckland*, 1970. *Apud* MACKIE, A.M., 1975.

52. LÉVY, R. Sur les propriétés hémolytiques des pédicellaires de certains oursins reguliers. *C.R. Acad. Sci.*, *181*:690, 1925.

53. MACKIE, A.M.; LASKER, R. & GRANT, P.T. Avoidance reactions of a mollusc, *Buccinum undatum*, to saponin-like surface active substances in extracts of the starfish *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *26*:415, 1968.

54. MACKIE, A.M. Avoidance reactions of marine invertebrates to either steroid glycosides of starfish or synthetic surface-active agents. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, *5*(1):63, 1970.

55. MACKIE, A.M. Chemoreception *In* MALINS, D.C. & SARGENT, JR. eds. Biology, V. 2. San Francisco, Acad. Press. 1975. p. 69-105.

56. MACKIE, A.M.; SINGH, H.T. & FLETCHER, T.C. Studies on the cytolytic effects of sea star (*Marthasterias glacialis*) saponins and synthetic surfactants in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Mar. Biol.*, *29*:307, 1975.

57. MACKIE, A.M.; SINGH, H.T. & OWEN, J.M. Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in Echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, *56B*:9, 1977.

58. MENDES E.G.; ABBUD, L. & UMIGI, S. Cholinergic action of homogenates of sea urchin pedicellariae. *Science*, *139*:408, 1963.

59. MYNDERSE, J. S.; MOORE, R.E.; KASHIWAGI, M. & NORTON, T.R. Antileukemia Activity in the Oscillatoriaceae: Isolation of Debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. *Science*, *196*:538, 1977.

60. MORSE. D.E.; HOOKER, N.; DUNCAN, H. & JENSEN, L. Gama Aminobutyric Acid, a Neurotransmitter, Induces Planktonic Abalone Larvae to Settle and Begin Metamorphosis. *Science* *204*(4391):407, 1979.

61. OKADA, K. *et al.* A preliminary report on the poisonous effect of the *Toxopneustes* toxin upon the heart of oyster, 1955. *Apud* RUSSELL.

62. PATTERSON, M.J.; BLAND, J. & LINDGREN, E.W. Physiological response of symbiotic polychaetes to host saponins. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, *33*:51-56, 1978.

63. PÉRÈS, J.M. Recherches sur les pédicellaires glandulaires de *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Arch. Zool. exp. gén.* *86*:118, 1950.

64. NIGRELLI, R.F. & JAKOWSKA, S. Effects of holothurin, a steroid saponin from the Bahamian sea cucumber (*Actinopyga agassizi*), on various biological systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *90*:884, 1960.

65. QUILLIAM, J.P. The mechanism of action of murexine on neuromuscular transmission in the frog. *Br. J. pharmac. Chemother.*, *12*:388, 1957.

66. RICCIO, R.; SIMONE, F. De; DINI, A.; MINALE, L.; PIZZA, C. & ZOLLO, F. Cyclic Steroidal glycosides from starfishes. *Third International Symposium on Marine Natural Products*, Brussels, Belgium, 1980.

67. RIOS, E.C. *Brazilian Marine Mollusks Iconography.* Rio Grande do Sul, Brasil, Ed. Emma, 1975. 331.p.

68. ROS, J. Sistemas de defensa en los Opistobranquios. *Oecologia Aquatica*, (2) :41, 1976.

69. ROSEGHINI, M. Occurrence of Dihydromurexine (Imidazolepropionylcholine) in the Hypobranchial Gland of *Thais* (*Purpura*) *haemastoma*. *Experientia*, *27*:1008, 1971.

70. ROSEGHINI, M. & FICHMAN, M. Choline esters and imidazole acids in extracts of the hypobranchial gland of *Thais haemastoma*. *Comp. gen. Pharmacology*, *4*:251, 1973.

71. RUGGIERI, G.D. Echinoderm toxins. II. Animalizing action in sea-urchin development. *Toxicon*, *3*:157, 1965.

72. RUGGIERI, G.D. Drugs from the sea. Marine organisms with novel chemical constituents are excellent sources of new drugs. *Science*, *194*:491, 1976.

73. RUSSELL, F.E. Marine toxins and venomous and poisonous marine animals. *Adv. mar. Biol.*, *3*:284, 1965.

74. RUSSELL, F.E. Pharmacology of toxins of marine organisms. *In* RASKOVA, H. ed. *Pharmacology and Toxicology of Naturally-Occurring Toxins*. Oxford, Pergamon Press, 1971. p. 3-98.

75. SCHMITZ, F.J. Recents developments in reesarch on metabolites from Caribbean marine invertebrates. *Third International Symposium on Marine Natural Products*, Brussels, Belgium, 1980.

76. SCHROEDER, R.E. *Sea Front*, *8*:156, 1962 *Apud* ENDEAN, 1972.

77. SIMONE, F. De; DINI, A.; FINAMORE, E.; MINALE, L.; PIZZA, C. & RICCIO, R. Starfish Saponins IV. Sapogenins from the Starfish. *Astropecten aurantiacus* and *Marthasterias glacialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *64B*:25, 1979.

78. SIMONE, F. De; DINI, A.; MINALE, L.; RICCIO, R. & ZOLLO, F. The sterols of the Asteroid *Echinaster sepositus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, *66B*:351, 1980.

79. SOUTHCOTT, R.V. Human Injuries from Invertebrate Animals in the Australian Seas. *Clin. Toxicol.*, *3*(4) :617, 1970.

80. STALLARD, M.O. & FAULKNER, D.J. Chemical Constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica* I. Importance of diet. *Comp. Biochem. Physiol.*, *49B*:25, 1974.

81. TCHANG-SI, T. *Contribution à l'étude des Mollusques Opistobranches de la côte provençale.* Thèse, Lyon, 1931 *Apud* ROS, J. 1976.

82. THOAI, N., van & ROCHE, J. Phosphagens of marine animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *90*:923-928, 1960.

83. THOMPSON, T.E. Defensive adaptations in opisthobranchs. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, *39*:123-134, 1960.

84. THOMPSON, T.E. & BENNETT, I. *Physalia* nematocysts-utilized by Molluscs for defense. *Science*, *166;* 1532, 1969.

85. THOMPSON, T.E. & BENNETT, I. Observations on Australian Glaucidae (Mollusca; Opistobranchia), 1970. *Apud* ROS, 1976.

86. von UEXKÜLL, J. Die Physiologie der Pediccelarien, 1899. *Apud* RUSSELL, F.E. 1971.

87. YASUMOTO, T.; NAKAMURA, K.; HASHIMOTO, Y. *Agr. Biol. Chem.* *31*:7, 1967. *Apud* GOAD, L.J., 1976.

88. WHITTAKER, V.P. Pharmacologically active choline esters in marine gastropods. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *90*:695, 1960.

89. WINKLER, L.R. Preliminary tests of the toxin extracted from California sea hares the genus *Aplysia*. *Pacific Sci.* *15*:221, 1961.

90. WINKLER, L.R.; TILTON, B.E. & HARDINGE, M.G. A cholinergic agent extracted from sea hares. *Arch. Int. Pharmacod. Thér.*, *137*:76, 1962.

91. WINKLER, L.R. & TILTON, B.E. Predation on the California Sea Hare, *Aplysia californica* Cooper, by the Solitary Great Sea Anemone, *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt) and the Effect of Sea Hare Toxin and Acetylcholine on Anemone Muscle. *Pacific Science*, *16*:286, 1962.

92. WINKLER, L.R. Distribution of Organic Bromine Compounds in *Aplysia californica* Cooper, 1863, The *Veliger*, *11*(3):268, 1969.

Mem. Inst. Butantan
44/45:213-218, 1980/81

ACUTE NECROTIC MYELOPATIA AFTER SPIDER BITE

Paulo E. MARCHIORI *
Milberto SCAFF *
José Paulo S. NÓBREGA *
Sérgio ROSENBERG *
José Lamartine de ASSIS *

ABSTRACT: A case of a 56 year-old patient bited by a spider, species *Loxosceles*, who developed a local bubbly lesion and after six days an ascendent necrotizing myelitis which progressed towards a rapid lethal exit. The authors emphasize the difficulties in establishing the aetiological diagnosis in the myelitis group of undetermined causes and report this present paper trying to relate the venomous accident and the spinal lesion. The mechanisms that could be responsible in the genesis of the spinal lesion and the behaviour of the antigenic complex of the toxine are discussed.

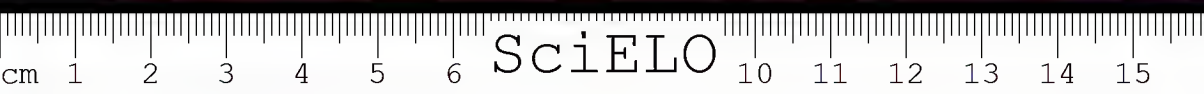
KEYWORDS: Acute myelitis — Spider bite.

INTRODUCTION

Necrotizing myelopathies are characterized by an acute aggression to the spinal cord with extensive necrosis and minimum signs of inflammation (Kissel, P., Schmitt, J. 1972). They are the expression of the action of many aetiopathogenic agents as well as different physiopathological mechanisms. There is a group of unknown causes and some are related to previous venomous accidents.

In *Arachnidae* accidents a neurological onset is rare but, depending on the species, an immediate onset, a temporary one, or a severe onset may occur, due to the toxine itself or to secondary systemic aggressions. (Chok et al., 1979, Dillaha et al, 1964, Gajardo-Tobar, 1966, Jacobs, 1969, Matthews et al, 1973, Pitts, 1962).

The scarcity of necrotizing myelopathy cases associated with venomous accidents, the difficulties in establishing an clinicopathologic correlation and the possible aetiopathogenic mechanisms justify this communication.

* Division of Neurology Department of Neuropsychiatry University of São Paulo, School of Medicine. Brazil — P.O. Box 3461 — São Paulo, S.P. — Brazil.

CASE REPORT

A 56 year-old negro man, Brazilian, married, farmer, coming from a region in the hinterland of the São Paulo State, was examined on the 24th of December, 1979, reporting that three days ago, he had been bited by a spider on the left buttock. Soon after, he started to feel a general physical indisposition, shivering fits and local pain from the bite. Two days before being hospitalized he felt strong headache, nausea and vomiting. One day before, he felt feeble an his left lower limb ached, and in the same day the right leg was also involved. The patient was examined at the Butantan Institute (São Paulo), where by the characteristics of the lesion, the bite was diagnosed as due to *Loxosceles* spider.

Patient in a regular general state, with a mild dyspnea, not icteric or cyanotic. Blood pressure 90 x 50 mm hg., pulse of 72 beats/min.; axillar temperature 37.2°C. There was a circular lesion of the skin and the subcutaneous sue of the left buttock with a diameter of approximately 2.0cm., with phlogistic signs and a meliceride crust. The pulmonary examination showed a slight inferior drawing with medium subcrepitant stertorous breathing in the lower left lung. The cardiovascular apparatus had rythmical noises and normophonetic heart sounds. The abdomen was normal. The patient lead a delay bladder catheter. The patient was anxious with contact difficulties due to the dyspnea. Applying the extension of superior members procedure these upper limbs fell globally and rapidly reflexes absent in the lower limbs, present and symetrical in the upper limbs. Hypotonia in the lower limbs. The superficial abdominal reflexes, the cremasteric and the plantar reflexes were absent. Superficial anesthesia of the great toes. Rigidity of the neck. Urinary retention. The cranial nerves were normal. The hematological examination disclosed a normochromic anemia and leukocytosis of 15,000/mm^3. The other routine laboratory investigations were normal. The results of the cerebrospinal fluid examination are shown in table I. Normal descendent iodized oil perimyelographya.

Evolution: The neurological form, first represented by a crural paraparesis with a sensory syndrome, which pointed to damage at the lombosacral segment, developed rapidly with a severe flaccid paralysis of the lower limbs. The motor manifestations assumed an ascending character, which attained moderately the upper limbs, but the sensory disorders reached the fourth thoracic level, and consisted of thermical, tactile and painful anesthesia and loss of position sense in the great toes. Death occurred on the third day after the onset of the spinal involvement.

The general pathological aspect showed a bilateral pneumonia and an acute splenitis. The brain weighed 1,400g. The external examination of the brain and the verticofrontal cuts showed no abnormality. The spinal cord was completely softened from the third cervical to the first sacral segment. The meninges and the blood vessels showed no modifications.

The only microscopic modifications were in the spinal cord, both in the white and in the gray matter, being more marked in the thoracic and high lumbar levels. At these points, the spinal cord was entirely necrotized, formed by tissue debris. In these, the only type of cells

MARCHIORI, P. E.; SCAFF, M.; NÓBREGA, J. P. S.; ROSENBERG, S. & ASSIS, J. L. Acute necrotic myelopatia after spider bite. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:213-218, 1980/81.

TABLE I

Results of the Examinations of the Cerebrospinal fluid

Date	Puncture	Aspect	Global Citology LE	Global Citology ER	Specific % L	Specific % M	Specific % N	Cloride	Biochemical mg/dl Glycosis	Biochemical mg/dl Protein	Pandy	Takata	Immunological Reactions Syphillis Cysticercosis	Bacteriological Examination
24/12/79	SOD	Turbid	1365	213	—	—	—	—	—	50	—	—	Neg.	Neg.
26/12/79	LD	Colorless	1450	170	3	1	96	745	78	44	+	+ V	Neg.	Neg.
27/12/79	SOD	Turbid	3360	0	2	0	98	665	58	67	—	—	Neg.	Neg.
27/12/79	LD	Turbid	1280	0	2	1	97	681	28	196	+ +	+ V	Neg.	Neg.
29/12/79	LD	Turbid	42700	1365	2	1	97	659	20	490	+ +	+ V	Neg.	Neg.

SOD. Suboccipital; LD. Lombar; LE. Leukocytes; ER. Erythrocytes; L. Limphocytes; M. Monocytes; N. Neutrophils; Neg. Negative; + weakly positive; ++. Strongly positive; + V. positive red.

recognizable were polymorphonuclear leukocytes. Inwardly or amidst the tissue debris most of the blood vessels showed fibrinoid necrosis. In the segments where the necrosis was milder, the spinal parenchyma was feeble, spongelike, areolated, being impossible to differenciate between the gray and the white matter. Focal collections of polymorphonuclear leukocytes were scattered randomly on the tissue, mostly on the perivascular areas. The little nuclei still visible did not allow any cell identification. Exceptionally neuronals ghosts were present (figure 1). A ring like nervous tissue, better structured, was visible in the spinal periphery, near to the piameter.

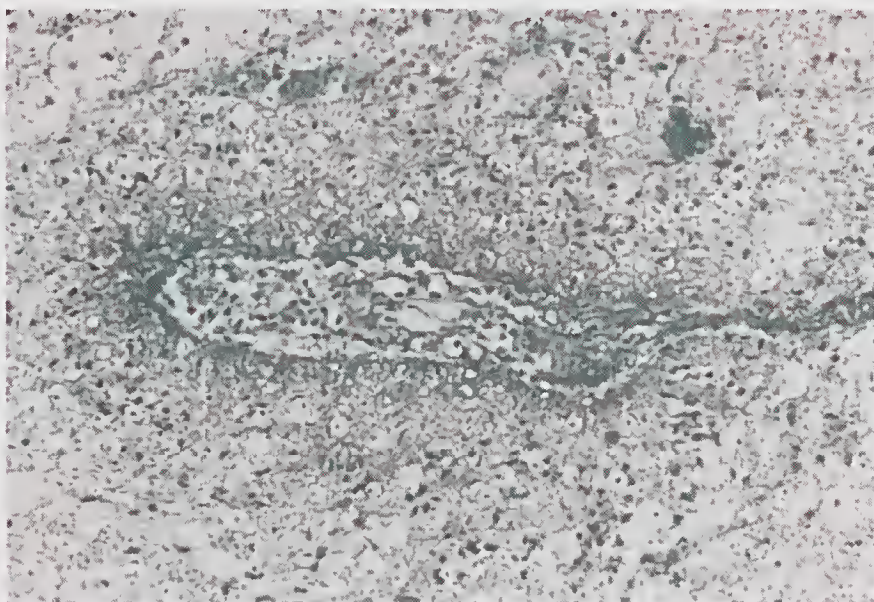



Fig. 1 — Microscopic aspect in the spinal cord: necrotized areas and polymorphonuclear leukocytes are seen; the cells are mostly on the perivascular region. Hematoxylin and eosin stain. A=X 78 B=X 200.

In the upper cervical and the low sacral segments, the appearance was practically normal, with the presence of some rare cuff of limphocyte cells surrounding the intraparenchymatous vessels.

The whole of the spinal cord, the meninges and the nervous roots had no histological alterations, with the exception of some rare and discrete lymphatic perivascular sheaths in the meninges.

DISCUSSION

In this case, the concomitance of the venomous accident (loxoscelism) with the persistance of the bubbly lesion on the left glutes region, which maintains the toxine in side it, and the development of the necrotizing myelitis deserve considerations on a possible correlation between the

events (Limber et al, 1962). Considering the antigenic aspect, it is known that the venom of certain spiders can lead to immediate and late immune reactions, consuming the complement C_5 (Futrell et al, 1978, Majesk et al, 1976, Smith et al, 1970). The severeness of the systemic lesions depends on the period of inoculation and on the resistance of the host (Gajardo-Tobar, 1966). The pathological aspect of this case does not allow us to assert the relation between the venomous lesion in the gluteal region and the myelitis, but this possibility cannot be rejected because the toxine diffusion of the inoculate in the spinal cord can be biphasic and can occur through the lymphatic vessels, foreign arterial adventitia and veins, and may ascend by the Batten plexus, and spinal.

RESUMO: Os autores apresentam caso de paciente de 56 anos de idade picado por aranha, Loxosceles, desenvolveu lesão bolhosa no local. Após seis dias houve aparecimento de mielite necrosante ascendente que evoluiu rapidamente para êxito letal. São enfatizadas as dificuldades para se estabelecer o diagnóstico etiológico nas mielites de causa indeterminada e são feitas tentativas de correlação entre o acidente peçonhento e a lesão espinal.

Os mecanismos responsáveis pela gênese da lesão espinal e o comportamento antigênico complexo de toxina são discutidos.

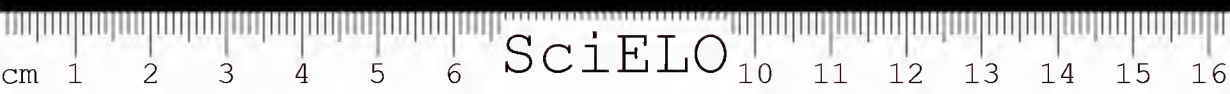
PALAVRAS-CHAVE: Mielite aguda. Picada de aranha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FUTRELL, M.J. & MORGAN, N.P. Inhibition of human complement components by Loxosceles recluse venom. *Int. Arch. Allergy appl. Immun.*, *57*:275-278, 1978.
2. GAJARDO-TOBAR, R. El araneismo en el mundo tropical y subtropical. *Mem. Inst. Butantan*, *33*:45-54, 1966.
3. GAJARDO-TOBAR, R. Mi experiencia sobre Loxoscelismo. *Mem. Inst. Butantan*, *33*:689-698, 1966.
4. HOREN, P.W. Arachnidism in the United States. *J. Amer. med. Ass.*, *185*: 839-843, 1963.
5. JACOBS, W. Possible peripheral neuritis following a black widow spider bite. *Toxicon*, *6*:299-300, 1969.
6. KISSEL, P. & SCHMITT, J. Myélopathies aigües — *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Neurologie*. Paris, Tome II 17071-A[10], 1972.
7. LIMBER, S.W. & WINER, R. Aseptic meningitis and probable ascending transverse myelites following a centipede bite. *Hawaii med. J.*, *22*:35-36, 1962.
8. MAJESKI, A.J. & DURST, G.G. Necrotic Arachnidism. *South med. J.*, *69*: 887-891, 1976.
9. MATTHEWS, D.; RAPP, F.W. & JOHNSON, W.E. The brown recluse spider and necrotic arachnoidism. *Neb. St. med. J.*, *4*:113-116, 1973.
10. OLSSON, I. & VENGE, P. The role of the eosinophil granulocyte in the inflammatory reactions. *Allergy*, *34*:353-367, 1979.
11. PITTS, C.N. Necrotic Arachnidism. *N. Engl. J. Med.*, *267*:400-401, 1962.
12. SMITH, W.C. & MICKS, W.D. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the Brown Spider, Loxosceles reclusa. *Lab. Invest.*, *22*:90-93, 1970.

---

13. STÖHR, M.; DICHGANS, J. & DÖRSTELMANN, D. Ischaemic neuropathy of the lumbosacral plexus following intragluteal injection. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, *43*:489-494, 1980.

14. WHITELEY, A.M.; HAUW, J.J. & ESCOUROLLS, R. A pathological surgery of 41 cases of acute intrinsic spinal cord disease. *J. Neurol. Sci.*, *42*: 229-242, 1979.

Mem. Inst. Butantan
44/45:219-231, 1980/81

SOBRE A IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *POROCEPHALUS* (PENTASTOMIDA) *QUE OCORREM EM* OFÍDIOS DA AMÉRICA TROPICAL

A. Arandas REGO *

Como homenagem ao Instituto Butantan que completa 80 anos de atividades de pesquisas, imortalizando o nome de seu fundador Vital Brazil, iniciamos nossos estudos de Pentastomida da Coleção Parasitológica desse Instituto.

RESUMO: Foram estudados espécimes de *Porocephalus* (Pentastomida) obtidas de espécies de ofídios do Brasil e que ocorrem em toda a América Tropical. São cinco as espécies de *Porocephalus* : *P. crotali* (Humboldt, 1808) dc crotalídeos; *P. stilesi* (Sambon, 1910) de *Lachesis muta*, *P. clavatus* (Wilman, 1847) de boídeos e sucuri, *P. tortugensis* Rilcy & Self, 1979 de *Crotalus tortugensis* e *P. basiliscus* Riley & Self, 1979 dc *Crotalus basiliscus*. O autor é de opinião quc apenas *P. stilesi* e *P. basiliscus* são bem caracterizadas tendo em vista a simples utilização de caracteres morfológicos; que consistem no número dc *annulus*, na forma do corpo e o poro genital salientc (apenas em *P. basiliscus*). A espécie *P. tortugensis* não possui caracteres diferenciais suficientes para distingui-la de *P. crotali* devendo cair na sinonímia deste último nome. Sugere, também, que sejam mantidos provisoriamente os nomes das espécies associados ao do hospedeiro e que nesta ordem de idéias provavelmente os Porocephalus de *Bothrops* constituiriam uma nova espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Pentastomida * — *Porocephalus* * — Ofídios * — América Tropical

INTRODUÇÃO

Recentemente estudamos larvas de *Porocephalus* coletados de mamíferos (REGO, 1980). Essas larvas carecem de suficientes caracteres morfológicos diferenciais; na ocasião preferimos identificá-las à espécie

* Pesquisador do Departamento de Helmintologia. Instituto Oswaldo Cruz, RJ Bolsista (Pesquisador II-A) do C. N. Pq.

Porocephalus crotali (Humboldt, 1808), aliás como vinha sendo feito pela maioria dos estudiosos do grupo.

O gênero *Porocephalus* Humboldt, 1811 é constituído por parasitas cujos adultos habitam o pulmão de ofídios na América e na África. Estas espécies possuem o corpo arredondado e por vezes dilatado nas extremidades, principalmente na região do cefalotórax. Os *annuli* nem sempre são evidentes, principalmente nas fêmeas ovígeras, o que dificulta a sua contagem. As garras têm ganchos desiguais, os externos possuem uma espécie de apêndice digitiforme pouco esclerotizado e portanto frágil (figs. 1 e 8) ; os ganchos internos não possuem esse apêndice, salvo nas primeiras mudas larvares (figs. 2-3), quando é presente nos quatro ganchos. É sabido que as larvas de pentastomídeos são ubíquas, elas podem ser encontradas em diversas espécies de mamíferos selvagens e experimentalmente em diversas espécies de roedores de laboratório (FONSECA, 1939). As larvas podem ser encontradas enquistadas no fígado, pulmão, peritôneo e outros locais. Larvas podem ser também encontradas em serpentes, além de adultos no pulmão, mas este mecanismo de desenvolvimento não é ainda bem compreendido.

SAMBON (1922), HEYMONS & VITZTHUM (1935), SELF & McMURRAY (1948), entre outros, referiram três espécies de *Porocephalus* para a America Tropical : *P. crotali* (Humboldt, 1808), em crotalídeos; *P. clavatus* (Wiman, 1847) em boídeos e sucuri e *P. stilesi* (Sambon, 1910) em *Lachesis*, *Bothrops* e *Helicops* (cobra d'água). Todos referem a dificuldade de diferenciar essas espécies se apoiados apenas em caracteres morfológicos, abstraindo do hospedeiro.

Sendo nossa intenção pesquisar caracteres morfológicos, que a semelhança dos helmintos pudessem ser utilizados como caracteres diferenciais, estudamos estruturas endurecidas, como as garras (ganchos), a armadura bucal quitinosa e as peças copuladoras do macho, além de outros caracteres, como as dimensões totais, a forma das extremidades e o número de *annulus* do corpo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados espécimes coletados de *Constrictor constrictor* (jibóias), *Eunectes murinus* (sucuri), *Lachesis muta* (surucucu), *Bothrops jararaca* e *Crotalus terrificus* (cascavel). Material este proveniente da Coleção Helmintológica do IOC e da Coleção de Parasitologia do Instituto Butantan, que o cedeu por empréstimo.

Os espécimes já se encontravam fixados pelo formol-acético (líquido de Railliet & Henry). Os machos foram montados "in totum", mas as fêmeas tiveram de ser seccionadas para montagem em mais de uma lâmina. Os ganchos e o anel bucal foram dissecados e montados separadamente do corpo. A diafanização foi feita pelo ácido fênico, após prévia desidratação. Montagem em creosoto de faia e bálsamo do Canadá. Microfotografias feitas em equipamento Olympus e os desenhos em câmara clara universal.

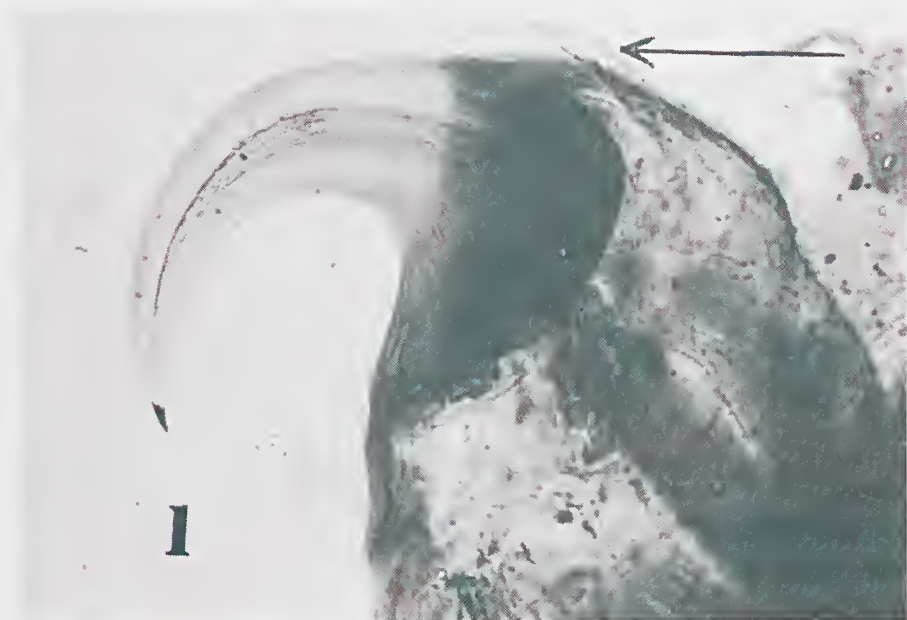



Fig. 1 — *Porocephalus* sp. adulto: gancho externo: indicado o apêndice digitiforme. Microfotografia.

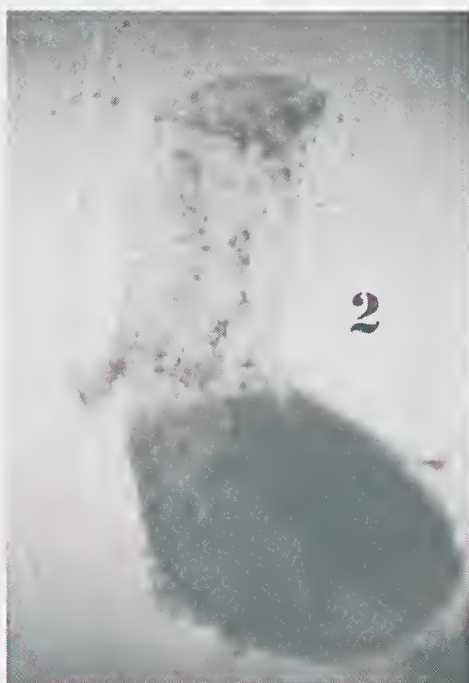



Fig. 2 — Larva de *Porocephalus* coletado de *Eunectes murinus*: nota-se o quisto. Microfotografia. Oc 6 x obj. 2,5.

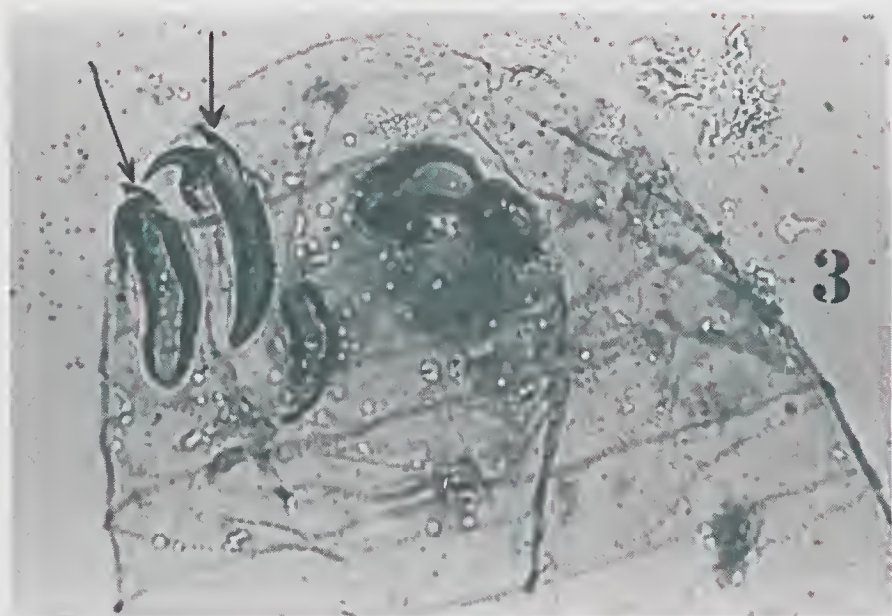



Fig. 3 — Larva de *Porocephalus* coletado de *E. murinus*: indicado o apêndice digitiforme nos ganchos externo e interno. Microfotografia.

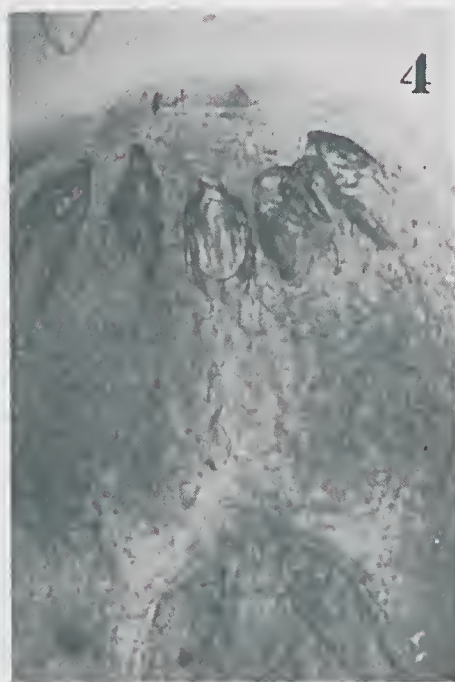



Fig. 4 — *P. crotali*, macho: extremidade anterior. Microfotografia. Oc. 6 x obj. 4.

RESULTADOS

O exame das peças endurecidas não forneceu elementos que servissem para a separação morfológica daquelas espécies. As garras, a armadura bucal e o aparelho copulador do macho tem grande uniformidade neste grupo de pentastomídeos (figs. 4-7). Parece-nos que as dimensões dos espécimes, o número de *annulus* e a forma das extremidades ainda constituem os melhores caracteres diferenciais, sendo que o número de anéis talvez seja o melhor desses caracteres, uma vez que o seu número é constante no adulto e provavelmente também nas últimas mudas larvares.

Estamos convencidos no entanto de tratar com espécies diferentes, mesmo porque os pentastomídeos são bastante específicos quanto ao hospedeiro final. Somos também de opinião que a espécie mais fácil de identificar é *Porocephalus stilesi* de *Lachesis muta;* ela se distingue bem das demais espécies pelos machos; eles têm o cefalotórax bem mais dilatado que a extremidade posterior e o corpo se atenua grandemente da parte anterior para a posterior. Este foi um caráter constante em todos os machos examinados (fig. 9). As fêmeas embora não sejam assim afiladas, são no entanto mais alongadas que as fêmeas das outras espécies. No entanto o número de *annulus* é sem dúvida o melhor caráter, seu número em *P. stilesi* foi de 46-54 (vide quadros), podendo mesmo ultrapassar esse número. Nos espécimes de outros ofídios, o número de *annulus* não ultrapassa em geral os 40. Essas características já foram anteriormente mencionadas.

HEYMONS (1935) e SELF & McMURRAY (1948) mencionaram a dificuldade de identificar as espécies de *Porocephalus* da América, utilizando caracteres morfológicos. Acharam ser o hospedeiro um dos melhores critérios para identificação das espécies. RILEY & SELF (1979) tentaram esclarecer o problema de determinação dessas espécies; dos espécimes por eles obtidos. Para o material recente estabeleceram eles puderam reestudar material depositado no Museu Britânico, além duas novas espécies: *P. tortugensis* Riley & Self, 1979 e *P. basiliscus* Riley & Self, 1979. Eles informaram que somente foram capazes de diferenciar essas duas espécies e as outras reestudadas, graças à utilização de método estatístico (análise de variância).

Pensamos que, embora a estatística tenha suas aplicações dentro de determinados parâmetros, não possui valor para a diferenciação prática dos *Porocephalus;* continuam as mesmas dificuldades que referimos. As tabelas de medidas por eles apresentadas (Quadro I) não parecem diferenciar as espécies, isto se excluirmos a análise estatística e nos atermos apenas ao quadro. É sabido que estas espécies inclusive apresentam ampla variação nas dimensões dos ganchos, o que também pudemos constatar (Quadro II); note-se que as medicões de nossos espécimes coletados de *Crotalus terrificus* são bastante diferentes das que RILEY & SELF apresentaram. Isto poderia invalidar a análise estatística dessas espécies.

Das duas espécies que descreveram, parece-me que *P. basiliscus* possui um excelente caráter morfológico, que é o poro genital saliente (fig. 10), caráter esse que não é evidente nas demais espécies de *Porocephalus*.

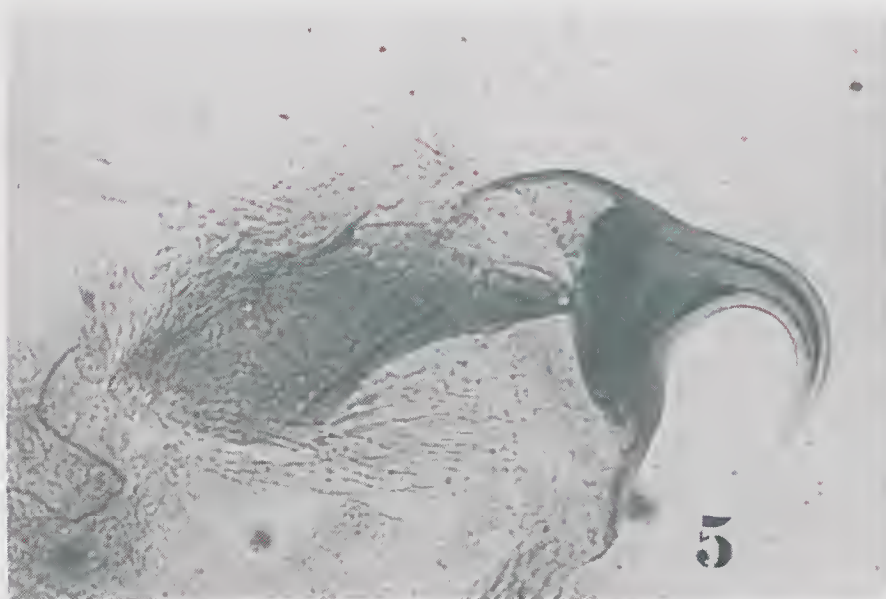



Fig. 5 — *P. clavatus*, de *Constrictor constrictor*: gancho interno. Microfotografia. Oc. 6 x obj. 10.

Fig. 6 — *P. clavatus*, de *C. constrictor*: anel bucal. Microfotografia. Oc. 6 x obj. 10.

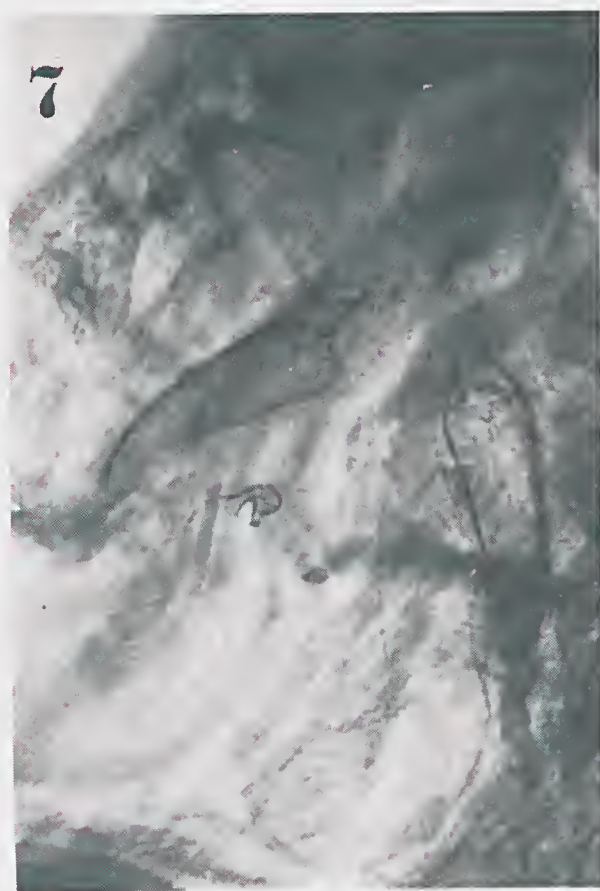



Fig. 7 — *P. clavatus*, de *C. constrictor*: peças copuladoras do macho. Microfotografia. Oc. 6 x obj. 4.

REGO, A. A. Sobre a identificação das espécies de *Porocephalus* (Pentastomida) que ocorrem em ofídios da América Tropical. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:219-231, 1980/81.

QUADRO I

Espécies de *Porocephalus* nas Americas
(segundo Riley & Self, 1979)
(medidas em mm)

Espécies	Comprimento		Annulus		Garras (ganchos)		Hospedeiros	D. geográfica
—	♂	♀	♂	♀	♂	♀	—	—
P. crotali	27 — 36	44 — 78	37 — 40	36 — 39	AC = 0,197 — 0,235 CB = 0,188 — 0,223 AD = 0,368 — 0,429	0,292 — 0,352 0,281 — 0,336 0,524 — 0,573	*Crotalus* spp. *Agkistrodon piscivorus*	USA América Tropical
P. clavatus	20 — 40	48 — 78	35 — 39	36 — 40	AC = 0,259 — 0,266 CB = 0,235 — 0,249 AD = 0,437 — 0,500	0,417 — 0,476 0,363 — 0,413 0,672 — 0,775	*Boa* spp. *Epicrates cenchris*	América Tropical até México
P. stilesi	26 — 36	62 — 102	40 — 45	40 — 49	AC = 0,211 — 0,250 CB = 0,219 — 0,263 AD = 0,382 — 0,435	0,324 — 0,389 0,332 — 0,389 0,596 — 0,640	*Lachesis muta*	América Tropical
Porocephalus sp.	26,5 — 30	70 — 97	37 — 39	37 — 40	AC = 0,280 * CB = — AD = 0,450	0,450 * — 0,700	*Bothrops* spp.	América do Sul
P. basiliscus	29 — 40	60 — 101	36 — 41	38 — 40	AC = 0,251 — 0,275 CB = 0,238 — 0,279 AD = 0,441 — 0,500	0,405 — 0,432 0,385 — 0,417 0,626 — 0,704	*Crotalus basiliscus*	México
P. tortugensis	18 — 31	58 — 88	36 — 39	37 — 38	AC = 0,221 — 0,239 CB = 0,209 — 0,229 AD = 0,372 — 0,433	0,335 — 0,378 0,316 — 0,348 0,581 — 0,635	*Crotalus tortugensis*	I. Tortuga California (USA) México

(*) dimensões aproximadas, deduzidas do gráfico estatístico

QUADRO II

Porocephalus spp. de Ofídios

Observação pessoal

(medidas em mm)

Ofídio	Comprimento		Annulus		Garras (ganchos)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Bothrops jararaca (Wied.)	35	60	38 — 40	± 40	AC = 0,210 CB = 0,210 — 0,225 AD = 0,375	0,225 — 0,330 0,240 — 0,330 0,465 — 0,510
Crotalus terrificus (Laur.)	38	48 — 60	± 36	± 40	AC = 0,315 — 0,360 CB = 0,300 — 0,360 CB = 0,570 — 0,600	0,360 0,300 — 0,330 0,540 — 0,585
Constrictor constrictor (L.)	31	*	36 — 40	—	AC = 0,225 — 0,255 CB = 0,202 — 0,240 AD = 0,330 — 0,390	—
Lachesis muta (L.)	32	80	46 — 54	50 — 52	AC = 0,195 — 0,285 CB = 0,195 — 0,225 AD = 0,315 — 0,375	0,360 — 0,405 0,300 — 0,375 0,630 — 0,675

* fêmeas em mau estado

Quanto à *P. tortugensis* as suas próprias medidas mostram sua semelhança com *P. crotali* (Quadro I), os próprios autores reconhecem que elas não podem ser diferenciadas baseando-se em caracteres morfológicos. Sugerimos pois que *P. tortugensis* seja considerado como sinônimo de *P. crotali*, tendo em vista a ausência de suficientes caracteres diferenciais.

CONCLUSÕES

Apenas *P. stilesi* e *P. basiliscus* são bem caracterizadas, tendo em vista a utilização dos caracteres da forma do corpo, o poro genital saliente e número de *annulus*. As demais espécies são praticamente impossíveis de diferenciar; talvez técnicas bioquímicas pudessem elucidar esse problema, pois se trata de espécies muito uniformes. Como um esquema provisório poderiam ser mantidos os antigos nomes, isto é, *P. crotali* (Humboldt, 1808) para os parasitos de *Crotalus terrificus*, *P. stilesi* (Sambon, 1910) para os de *Lachesis muta*, *P. clavatus* (Wiman, 1847) para os encontrados em boídeos e sucuri; além evidentemente de *P. basiliscus* de *Crotalus basiliscus*, pelas razões já expostas. Nesta ordem de idéias os espécimes provenientes de *Bothrops* deveriam constituir uma nova espécie; a propósito,

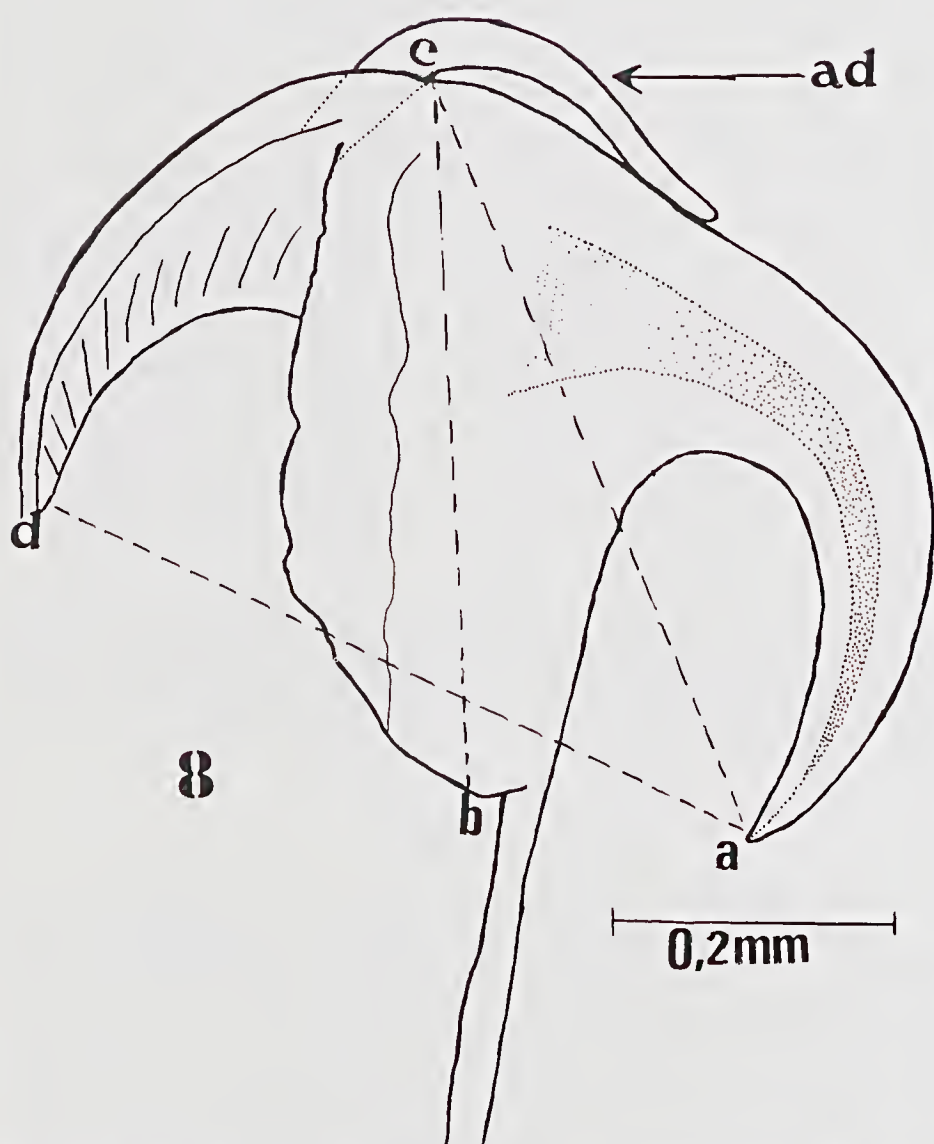



Fig. 8 — *P. clvatus*, de *C. cnstrictor*: gancho externo, indicado o apêndice digitiforme (ad.) Modelo de medição dos ganchos (AC, AD, BC).

Fig. 9 — *P. stilesi*, de *L. muta*: note o afilamento do corpo do macho, da extremidade anterior para a posterior.

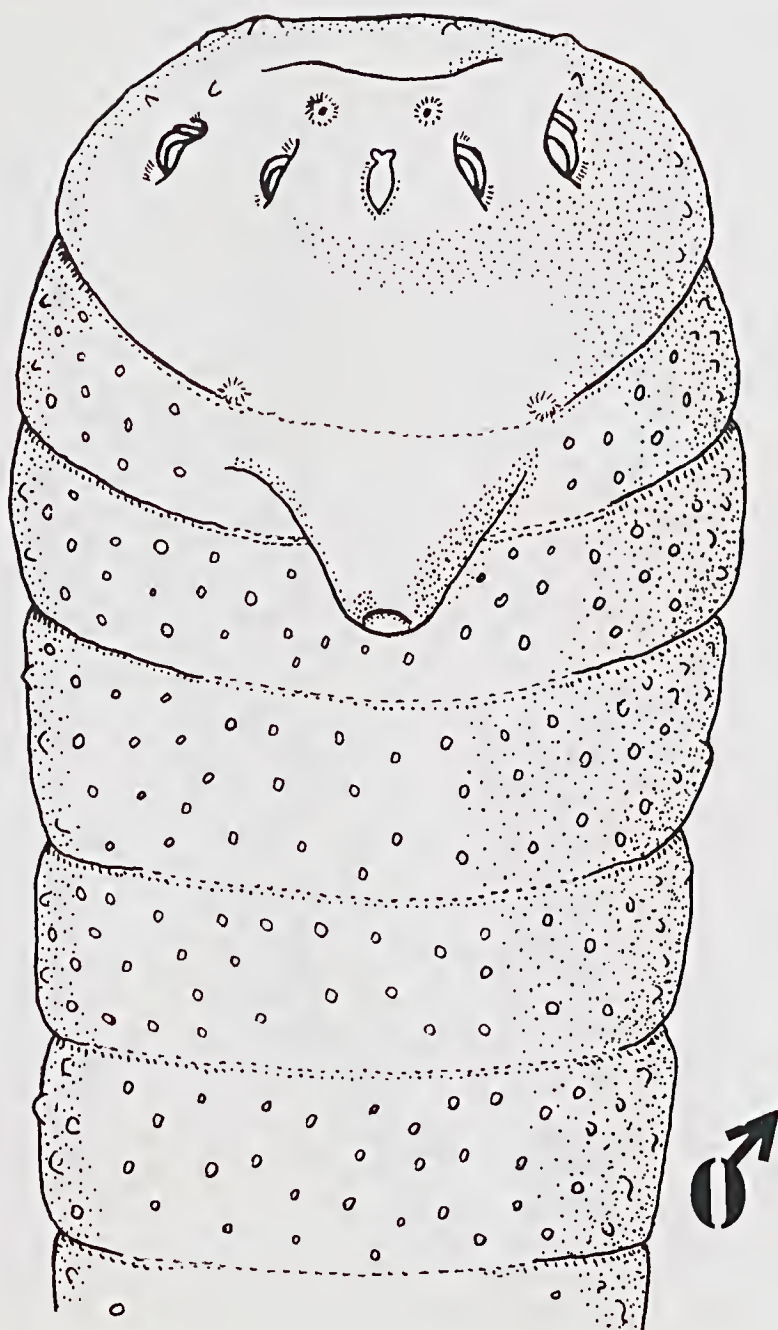



Fig. 10 — *P. basiliscus* (adaptado de Riley & Self, 1979): note o saliente poro genital.

RILEY & SELF (1979) chamaram a atenção para o fato dos espécimes que estudaram de *Bothrops* talvez constituíssem uma diferente espécie, mas em virtude da ausência de caracteres morfológicos que as caracterizem preferimos abstermo-nos de criá-la.

AGRADECIMENTOS

Expressamos nossos agradecimentos ao Dr. Lauro Travassos Filho, chefe da Seção de Parasitologia do Instituto Butantan de S. Paulo, que gentilmente cedeu parte do material que utilizamos neste trabalho.

ABSTRACT: The author studied specimens of *Porocephalus* (Pentastomida) collected from species of Ophidia; these species occur in Tropical America. He searched for characters that could be useful to distinguish the species referred to these hosts. Five species were referred to Tropical America: *P. crotali* (Humboldt, 1808) from *Crotalus terrificus*, *P. stilesi* (Sambon, 1910) from *Lachesis muta*, *P. clavatus* (Wiman, 1847) from *Boa* and anaconda, *P. tortugensis* (Riley & Self, 1979) from *Crotalus tortugensis*, *P. basiliscus* Riley & Self, 1979 from *Crotalus basiliscus*. In the author's opinion only *P. stilesi* and *P. basiliscus* are easily identified to the others species described, in using only morphological characters, mainly concerning to the *annulus* number, the body form and the genital pore. *P. tortugensis* seems to be a synonim of *P. crotalus*, because they can not be differentiated. He suggests also that the criterion of hosts is yet useful to separate these species of *Porocephalus*. By this reason the specimens from *Bothrops* must be considered a new species.

KEYWORDS: Pentastomida * — *Porocephalus* * — Ophidians * — Tropical America.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FONSECA, F. Observações sobre o ciclo evolutivo de *Porocephalus clavatus* especialmente sobre o seu orquidotropismo em cobaias. *Mem. Inst. Butantan*, *12*:185-190, 1939.

HEYMONS, R. & VITZTHUM, H.G. Beitrage zur systematik der Pentastomiden. *Zeits. für Parasitenk.*, *8*(1):1-103, 1935.

REGO, A.A. Estudos de pentastomídeos de mamíferos da coleção helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz. *Rev. Brasil. Biol.*, *42*(4), 1980 (no prelo).

RILEY, J. & SELF, J.T. On the systematic of the pentastomid genus *Porocephalus* (Humboldt, 1811) with descriptions of two new species. *System. Parasit.*, *1*(1):25-42, 1979.

SAMBON, L.W. A synopsis of the family Linguatulidae. *J. Trop. Med. Hyg.*, *25*:188-206, 391-428, 1922.

SELF, J.F. & MCMURRAY, F.B. *Porocephalus crotali* Humboldt (Pentastomida) in Oklahoma. *J. Parasit.*, *34*:21-23, 1948.

Mem. Inst. Butantan
44/45:233-238, 1980/81

NOTAS SOBRE ALGUNS PENTASTOMÍDEOS DE RÉPTEIS

A. Arandas REGO *

RESUMO: São feitas considerações sobre a morfologia e a taxonomia de três espécies de pentastomídeos de répteis, *Porocephalus crotali*, *Kiricephalus coarctatus* e *Diesingia megastoma*. De *P. crotali* é comentado o poro genital conspícuo nos dois espécimes estudados. *Hydrodynastes bicinctus*, um colubrídeo, é um novo hospedeiro de *Kiricephalus coarctatus*; na sinonímia desta espécie é colocado *K. constrictor* Riley & Self, 1979. Quanto a *D. megastoma*, é estabelecida a sua posição taxonômica em família independente; o nome *Butantanella* é posto na sinonímia de *Diesingia*.

PALAVRAS-CHAVE: Pentastomídeos. *Porocephalus crotali*, *Kiricephalus coarctatus* e *Diesingia megastoma*. Répteis.

INTRODUÇÃO

Prosseguindo com o estudo de espécimes de pentastomídeos, da Coleção de Parasitologia do Instituto Butantan, tratamos agora de três espécies de Porocephalidea, respectivamente, *Porocephalus crotali* (Humboldt, 1809), *Kiricephalus coarctatus* (Diesing, 1850) e *Diesingia megastoma* (Diesing, 1836). Da primeira espécie, *P. crotali*, discutimos um caráter (poro genital conspícuo) que não tínhamos observado em trabalho anterior (REGO, 1981). Citamos um novo hospedeiro para a espécie *K. coarctatus* e quanto a *D. megastoma*, confirmamos a sua posição taxonômica.

Como observamos em trabalhos anteriores, os pentastomídeos constituem um grupo que tem sido descurado pelos parasitologistas nacionais; a maior parte das espécies é conhecida de descrições antigas, ainda do material de Natterer; há portanto lacunas na taxonomia das espécies da região neotropical; pouco existe além dos trabalhos de SAMBON (1922) [7] e de HEYMONS & VITZTHUM (1935) [3].

* Depto. de Helmintologia, Fundação Oswaldo Cruz — Bolsista (Pesquisador) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Endereço para correspondência: Caixa Postal 926, CEP 20.000, Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimes já se encontravam fixados pelo formol. Para estudos de morfologia introduzimos uma técnica capaz de proporcionar bons resultados no esclarecimento (diafanização) da cutícula quitinosa. Usamos o hipoclorito de sódio diluído em álcool. Para diluição ele é preferível à água; usamos uma parte de hipoclorito de sódio para três partes de álcool. Podem ficar cerca de 24 horas nesta solução. Lavar depois em álcool a 70º e corar pelo carmin aluné de Granacher; obtém-se uma leve coloração rósea, suficiente para as observações necessárias. Desidratação na série de álcoois e passagem pelo fenol líquido para esclarecimento final. Montagem em creosoto de faia.

RESULTADOS

FAMÍLIA POROCEPHALIDAE

Parocephalus crotali (Humboldt, 1809)

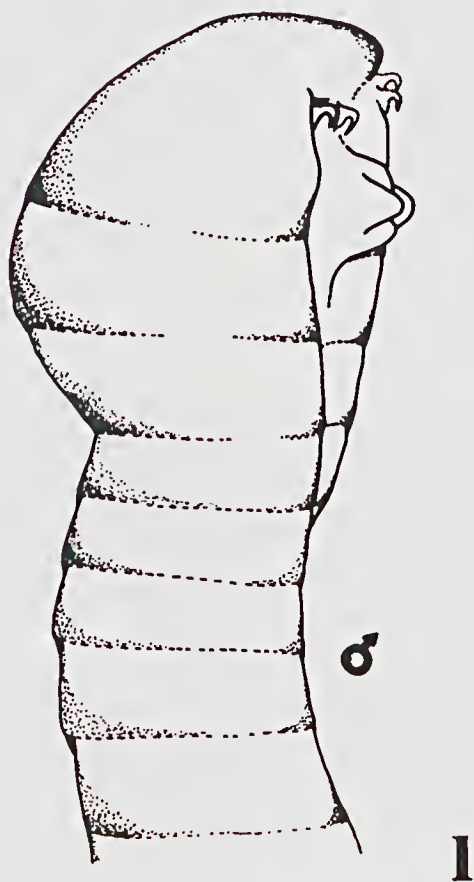



Fig. 1 — *Porocephalus crotali* (Humboldt, 1809): macho, genital saliente.

Hospedeiro — pulmão de *Crotalus terrificus* Laurenti

Proveniência — Instituto Butantan, São Paulo

Material da coleção de parasitologia, n.º 6.516.

Amostra constituída por apenas dois machos e uma fêmea; constatamos que ambos os machos exibiam poro genital conspícuo. Por este caráter diferiram dos espécimes anteriormente estudados (REGO, 1981).[4]

A fêmea mediu 75 mm de comprimento. O cefalotórax é mais dilatado que o anel caudal. Possui 34 *annulus*, sem contar os anéis caudal e do cefalotórax. Anéis visíveis mesmo sendo uma fêmea ovígera. Anel bucal pequeno e oval.

Os machos mediram o máximo de 38 mm de comprimento e têm o mesmo número de anéis que a fêmea. Poro genital saliente e conspícuo; abre no primeiro anel abdominal; é flanqueado por três dobras de cutícula. Os ganchos mediram em média: AC = 0,216 mm; CB = 0,192 mm e AD = 0,372 mm (medições conforme o esquema de RILEY & SELF, 1979).[5]

Considerações — SAMBON (1922)[7] ao reestudar as espécies de *Porocephalus* da região neotropical comentou que apenas na espécie *P. clavatus* de boídeos, os machos têm abertura genital proeminente, cercada por três papilas, sendo duas anteriores e uma posterior. Em trabalho recente (REGO, 1980),[4] examinamos grande número de espécimes machos do *P. crotali*, de cascavéis; nesses espécimes não observamos poro genital visível. Fizemos novo exame de machos coletados de *Boa constrictor*, de *Bothrops* e de *Lachesis*, a fim de avaliar esse caráter em outras espécies. Nos machos coletados de *Boa constrictor* o poro genital saliente é uma constante, o que está de acordo com a observação de SAMBON; nas outras espécies esse caráter é raramente observado, embora possa estar presente em alguns espécimes.

As dimensões dos ganchos nesses dois espécimes de *Crotalus* concordam com as do estudo anterior (REGO, 1980) [4]. O poro genital não deve, portanto, ser levado em conta isoladamente. Excetuamos apenas a espécie *P. basiliscus*, de *Crotalus basiliscus* do México, descrita por RILEY & SELF (1979)[5] como possuindo enorme e saliente poro genital.

Kiricephalus coarctatus (Diesing, 1850)

Hospedeiros — pulmão e cavidade geral de *Hydrodynastes bicinctus* (Hermann, 1804) e pulmão de *Dryadophis bifossatus* Raddi (=*Drymobius bifossatus*).

Proveniências — Rio Approyage, Guiana francesa (*Hydrodynastes*) e Inst. Butantan (*Dryadophis*).

Material da coleção de parasitologia do I. Butantan, números, 5.473 e 5.919.

Trata-se de seis exemplares ninfas; mediram o máximo de 20 mm de comprimento e têm cerca de 50 *annulus*. Os ganchos são simples, relativamente grandes e de lâmina alongada, com cerca de 0,240 mm de comprimento. O anel bucal quitinoso mediu 0,250 mm x 0,120 mm, tem forma oval.

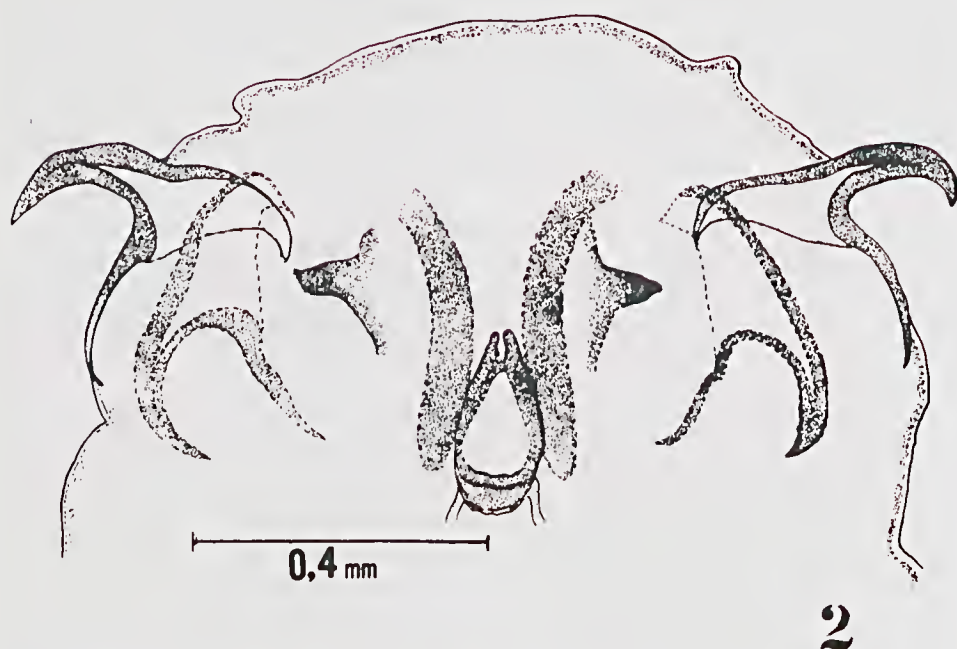



Fig. 2 — *Kiricephalus coarctatus* (Diesing, 1850): ninfa, cefalotórax.

Apenas um espécime macho, coletado de *Dryadophis;* mediu 32 mm de comprimento. A cabeça é dilatada, mediu 1,6 mm x 2 mm. Ganchos iguais, a lâmina do par externo mediu 0,228 mm de comprimento. O anel bucal mediu 0,312 mm x 0,180 mm.

Considerações — O gênero *Kiricephalus* se caracteriza pelo cefalotórax alargado em relação ao início do abdome, em ambos os sexos, mas no macho isto não é tão nítido. *K. coarctatus* parasita várias espécies de colubrídeos das América do Norte e Sul, mas não tinha sido ainda referida em *Hydrodynastes bicinctus;* este é pois um novo hospedeiro para ela.

RILEY & SELF (1979)[6] revisaram o gênero *Kiricephalus* e propuseram uma nova espécie, *K. constrictor,* para os parasitos que encontraram em *Boa constrictor.* Em nossa opinião essa espécie não pode ser diferenciada de *K. coarctatus;* como eles mesmos referem, ambas espécies têm praticamente o mesmo número de *annulus* (52 em *K. coarctatus* e 54 em *K. constrictor*), além de se superporem geograficamente. Sugerimos que *K. constrictor* seja considerado sinônimo de *K. coarctatus* até que seja demonstrada a existência de suficientes caracteres diferenciais.

FAMÍLIA DIESINGIIDAE *Nomen novum*

Diesingia megastoma (Diesing, 1836) Fonseca & Ruiz, 1956 sin.: *Butantanella megastoma* (Diesing, 1836) Fonseca & Ruiz, 1956

Hospedeiros — *Hydraspis geoffroyana* (Wagler) e *Hydromedusa tectifera* Cope

Proveniência — Instituto Butantan, S. Paulo

Material depositado na coleção de parasitologia do Inst. Butantan, números 5.906/8.

A principal característica desta espécie é sem dúvida o enorme anel bucal quitinoso, muito maior que os próprios ganchos. Não redescrevemos a espécie pois FONSECA & RUIZ (1956)[2] deram uma boa descrição da mesma. No entanto, o gênero *Butantanella* proposto não é necessário. *Diesingia* Sambon, 1922, estabelecido para estes parasitos de tartarugas aquáticas é sem dúvida um bom gênero.

Há apenas duas espécies de *Diesingia* além de *D. megastoma*, *D. kaehugensis* (Shipley, 1910), restrita à Ásia.

Colocamos *Butantanella* na sinonímia de *Diesingia*, aliás os autores já tratavam corretamente essa espécie como *D. megastoma*. Curioso que o trabalho de Fonseca & Ruiz tenha permanecido ignorado.

Persistem no entanto dúvidas sobre a posição taxonômica de *Diesingia*; FAIN (1961) [1] o tratou como Sebekidae e o mesmo fizeram outros autores. HEYMONS & VITZTHUM (1935) [3] trataram como subfamília independente. Concordamos com este último autor que não se trata de Sebekidae; provisoriamente sugerimos uma família nova, Diesingiidae, na ordem Porocephalidea.

AGRADECIMENTO

Expressamos os nossos agradecimentos ao Dr. Lauro Travassos F., da seção de Parasitologia do Instituto Butantan, pela cessão do material de estudo.

ABSTRACT: The author makes considerations on the morphology and taxonomy of three species of Pentastomid from reptiles, *Porocephalus crotali*, *Kiricephalus coarctatus* and *Diesingia megastoma*. About *P. crotali* he comments the conspicuos genital opening in two males he examined from *Crotalus terrificus*. The colubrid *Hydrodynastes bicinctus* is a new host for *K. coarctatus*; in the sinonimy of this species is placed *K. constrictor* Riley & Self, 1979. Finally, about *D. megastoma*, he places it in a independent family, Diesingiidae; *Butantanella* Fonseca & Ruiz, 1956 is placed in the sinonimy of *Diesingia* Sambon, 1922.

KEYWORDS: Pentastomids; *Porocephalus crotali*, *Kiricephalus coarctatus*, *Diesingia megastoma*. Reptilia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAIN, A. Les pentastomides de l'Afrique Centrale. *Musèe Royal de l'Afrique Centrale. Annales, sèrie in 8ème, Sciences Zoologiques*, 92:1-115, 1961.

2. FONSECA, F. & RUIZ, J.M. Was ist eigentliche *Pentastoma megastomum* Diesing, 1836? (Porocephalida, Porocephalidae). *Senck. Biol.*, *37*(5/6): 469-485, 1956.

3. HEYMONS, R. & VITZTHUM, H.G. Beitrage zur systematik der Pentastomiden. *Z. Parasitenk.*, *8*(1):1-102, 1935.

4. REGO, A.A. Sobre a identificação das espécies de *Porocephalus* (Pentastomida) que ocorrem em ofídios da América Tropical. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*, 1980/81 (no prelo).

5. RILEY, J. & SELF, J.T. On the systematics of the Pentastomid genus *Porocephalus* (Humboldt, 1811) with descriptions of two new species. *System. Parasit.*, *1*(1):25-42, 1979.

6. RILEY, J. & SELF, J.T. On the systematics and lifecycle of the Pentastomid genus *Kiricephalus* Sambon, 1922 with descriptions of three new species. *System. Parasit.*, *1*(2), 1979 (no prelo).

7. SAMBON, L.W. A synopsis of the family Linguatulidae. *J. Trop. Med. Hyg.*, *25*:188-206, 391-428, 1922.

Mem. Inst. Butantan
44/45:239-243, 1980/81

ENCONTRO DE PLEROCERCOS DE TRYPANORHYNCHA (CESTODA) EM OFÍDIO DE RIO DA AMÉRICA DO SUL

A. Arandas REGO *

RESUMO: São descritos os plerocercos de *Pterobothrium* (Trypanorhyncha), encontrados em cobra de água-doce, *Hydrodynastes bicinctus* da Guiana francesa. São feitas considerações sobre a raridade desse encontro, pois os répteis não são hospedeiros normais para essas larvas. São também citadas as referências de *Pterobothrium* spp. na América do Sul.

PALAVRAS-CHAVE: Plerocercos de *Pterobothrium*. Cestoda, Trypanorhyncha. Serpente, *Hydrodynastes bicinctus*.

INTRODUÇÃO

Examinando material coletado de cobras, pudemos separar alguns cistos que, dissecados, revelaram a presença de plerocercos de Trypanorhyncha. Essas larvas provêm de uma cobra de rio da Guiana francesa, cujo material foi depositado na Coleção de Parasitologia do Instituto Butantan.

Procedemos a uma revisão da literatura, tendo encontrado apenas as seguintes referências de plerocercos em ofídios, conforme DOLLFUS, 1942 (1) e YAMAGUTI, 1959 (3): Shipley, 1903, que referiu cistos de Trypanorhyncha em cobras do Sião (atual Tailândia); acrescentou tratar-se de colubrídeo proteróglifo, que se alimenta de peixes marinhos. Meggitt, 1931, que descreveu blastocisto encontrado em colubrídeo opistóglifo, que segundo aquele autor freqüenta o litoral marinho da Birmânia.

São pois muito raras as referências de plerocercos em ofídios e mesmo assim limitadas ao continente asiático. Não há referências de Trypanorhyncha larvares em cobras fluviais e na América, daí a oportunidade desta nota.

* Depto. de Helmintologia, Fundação Oswaldo Cruz — Bolsista Pesquisador) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Endereço para correspondência: Caixa Postal 926, CEP 20.000, Rio de Janeiro.

Fizemos a tentativa de identificação dos espécimes, o que só é possível até o gênero, *Pterobothrium* Diesing, 1850. A identificação específica foi impossível em virtude das probóscides estarem invaginadas, o que impossibilitou o estudo da armadura espinhosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Os cistos estavam fixados, de mistura com nematódeos fragmentados e espécimes de pentastomídeos (*Kiricephalus coarctatus*). As larvas foram dissecadas com agulhas e coradas pelo carmin de Granacher; clarificação em fenol líquido e montagem em bálsamo do Canadá e creosoto de faia. As microfotografias foram feitas em equipamento Olympus.

RESULTADOS

No fixador os cistos apresentavam-se envolvidos por material gelatinoso. São cistos alongados, providos de dois fortes envoltórios. Mediram o máximo de 14,40 mm de comprimento x 2 mm de largura. A larva localizava-se em uma das extremidades do cisto, ocupando cerca de 1/8 da dimensão do mesmo. O plerocerco isolado mediu 3,2 mm de comprimento. Ele tem escólex com 4 botridias, que mediram 0,300 — 0,336 mm de diâmetro. Probóscides retraídas dentro das bainhas. Os bulbos mediram 1,08 mm x 0,216 mm; são 4 ou 5 vezes mais longos que largos.

A armadura das probóscides é do tipo poeciloacantha, com 3 tipos diferentes de ganchos ou espinhos, o que é compatível com o gênero *Pterobothrium*.

Localização — cavidade geral.

Proveniência — Rio Approyage, Guiana francesa.

Hospedeiro — *Hydrodynastes bicinctus bicinctus*

Espécimes depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz sob o número 31.905 a-b e na coleção do Instituto Butantan sob o n.º 5.919.

CONSIDERAÇÕES

Os Pterobothriidae parasitam principalmente peixes de mares tropicais e subtropicais. As espécies de *Pterobothrium* (o gênero mais importante) são insuficientemente conhecidas pois não há boas descrições das armaduras das trombas, além disto algumas espécies foram descritas apenas de larvas, desconhecendo-se o adulto.

Na América do Sul foram referidas as seguintes espécies de *Pterobothrium*, segundo REGO, 1973 (2):

Espécies	Hospedeiros e proveniências
P. macrourum (Rud., 1819)	*Cherubincho lusitanorum* — Brasil *Micropogon undulatus* — Uruguai
P. heteracanthum Diesing, 1850	*Micropogon opercularis* (= *Micropogon lineatus* — Brasil)
P. crassicolis (Diesing, 1850)	*Oligoplites saliens, Hoplerythrinus unitaenitatus* (= *Erythrinus unitaeniatus*), *Sciaena* sp., *Dorus sp.* — Brasil
P. interruptus (Rud., 1819)	*Trichiurus lepturus* — Brasil
P. fragile (Diesing, 1850)	*Pristis perrottetii* — Brasil

Várias espécies de teleósteos de rios foram citados como apresentando larvas de espécies de *Pterobothrium*, mas apenas o "peixe-serra", *Pristis perrottetii*, possui as formas adultas desses Trypanorhyncha. Esse elasmobrânquio é capaz de subir os rios por longas distâncias, o que explicaria a existência de teleósteos amazônicos parasitados por larvas de *Pterobothrium*. No entanto não foram ainda correlacionados os parasitas adultos com as formas larvares nesses teleósteos.

Os ofídios não constituem hospedeiros normais para Trypanorhyncha, mas poderiam se infectar pela ingestão de crustáceos parasitados, ou ainda, pela ingestão de peixes que tenham os plerocercos. Esta última hipótese é mais remota, pois não parece provável que os plerocercos possam se reencistar em novo hospedeiro e produzir outros envoltórios císticos.

O ofídio colubrídeo, *Hydrodynastes bicinctus* também ocorre na região amazônica brasileira, onde é conhecido como "cobra d'água"; é uma cobra grande que sempre que pode se alimenta de crustáceos e também de peixes.

CONCLUSÕES

O ofídio de hábitos aquáticos (de água-doce), *Hydrodynastes bicinctus*, proveniente do Rio Approyage, Guiana francesa, é considerado como sendo um hospedeiro anormal, talvez acidental, para os plerocercos de *Pterobothrium* (Cestoda, Trypanorhyncha).

Trata-se da primeira referência na América de plerocercos de Trypanorhyncha em réptil.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. Lauro Travassos Filho, da seção de Parasitologia do Instituto Butantan, pela cessão do material e pelo apoio que vem prestando a estes estudos.

Fig. 1 — *Pterobothrium* sp., isolado do cisto. Oc. 6 x obj. 4.

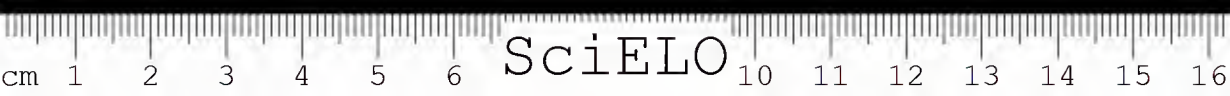
Fig. 2 — Cisto com plerocerco de *Pterobothrium* sp. Oc. x obj. 2,5.

REGO, A. A. Encontro de plerocercos de Trypanorhyncha (Cestoda) em ofídio de rio da América do Sul. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:239-243, 1980/81.

ABSTRACT: This paper deals with plerocercus of *Pterobothrium* (Cestoda, Trypanorhyncha) found encisted in *Hydrodynastes bicinctus*, colubrid ophidian from French Guyana. The author makes considerations on the rarity of this fact considering that reptilia are not usual hosts for these larvae. He relates also the references of *Pterobothrium* species in South America.

KEYWORDS: Plerocercus of *Pterobothrium*. Cestoda, Trypanorhyncha. Ophidian, *Hydrodynastes bicinctus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DOLLFUS, R.P. Étude critique sur les tétrarhynques du Muséum de Paris. *Arch. Mus. Hist. Nat.*, 6ème ser., tome 18ème. 466 pp., 1942.
2. REGO, A.A. Contribuição ao conhecimento dos cestóides do Brasil. I — Cestóides de peixes, anfíbios e répteis. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro, 16*(2/3):97-129, 1973.
3. YAMAGUTI, S. *Systema Helminthum*, 2. *The Cestodes of Vertebrates.* New York, Intersc. Publ. Inc., ed., 1959. p. 1-626, 769-860.

Mem. Inst. Butantan
44/45:245-251, 1980/81

EFEITOS SOBRE A TOXICIDADE DA MISTURA DE VENENOS E A SOBREVIDA DE EXEMPLARES DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* E *CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS*, SUBMETIDOS ÀS EXTRAÇÕES MANUAL E ELÉTRICA

Raymundo ROLIM-ROSA *
Hélio Emerson BELLUOMINI **
Medardo SILES-VILLARROEL ***
Hideyo IIZUKA ****

RESUMO: Os autores demonstram que o processo de extração de peçonha de serpentes das subespécies *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) e *Crotalus durissus collilineatus* Amaral, 1926, influi tanto na toxicidade do produto, quanto na sobrevivência dos exemplares. Embora a peçonha surdida na primeira oportunidade por estímulo elétrico fosse a mais tóxica, em termos de DL50 para camundongos inoculados pela via intravenosa, os produtos resultantes das operações seguintes apresentaram valores em escala decrescente; fenômeno inverso foi registrado com as peçonhas obtidas pelo processo de extração manual. No que diz respeito ao índice de sobrevida das serpentes submetidas ao processo de extração manual, foi verificado que houve uma diferença de 10% favorável ao mesmo, em relação ao processo de estímulo elétrico aplicado sobre as glândulas veneníferas.

PALAVRAS-CHAVE: Veneno crotálico; processos de extração; extração e toxicidade; extração e sobrevida de serpentes.

INTRODUÇÃO

O veneno de serpentes é, de um modo geral, um produto de natureza química complexa, dotado de diversas propriedades farmacológicas[2, 19, 20, 22, 24, 25, 26]. É sintetizado pelas glândulas veneníferas as quais se

---

* Diretor Técnico do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan, Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

** Pesquisador Científico Ref. PqC-6, Diretor Técnico do Serviço de Animais Peçonhentos do Instituto Butantan.

*** Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

**** Pesquisador Científico Ref. PqC-1, Encarregado do Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência: C.P. 65, São Paulo.

ROLIM-ROSA, R.; BELLUOMINI, H. E.; SILES VILLARROEL, M.; & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:245-251, 1980/81.

comunicam com os dentes inoculadores, sendo utilizado como arma de caça ou defesa e, em algumas espécies, desempenham funções de suco digestivo, de acordo com Fonseca [10] (1949). Além de conter enzimas e substâncias biologicamente ativas, a maioria dos componentes apresenta propriedades imunogênicas. A atividade letal resulta da interação dos componentes presentes nas peçonhas, sendo que alguns dos mesmos podem representar papel mais importante que os outros, para provocar a morte, conforme assinala Rosenfeld [19, 20] (1969-71).

Dentre os acidentes ofídicos registrados em nosso meio, o crotálico, de acordo com as observações de Fonseca [10] e Rosenfeld [19], assume maior importância, em virtude de representar aquele que causa maior número de óbitos. Os freqüentes casos de envenenamento causados por *Crotalus*, são explicados pela grande distribuição geográfica de seus representantes em nosso território [1, 13, 14].

Embora tratando-se de um veneno preponderantemente hemolítico e neurotóxico [2, 10, 19, 20, 25, 26], sua composição pode variar de acordo com a procedência das serpentes [12, 22].

Rosenfeld & Belluomini [21] (1960), e Belluomini [5] (1968), estudando a extração e a quantidade de peçonha de serpentes brasileiras, verificaram que alguns exemplares de *Crotalus* eram capazes de fornecer até 220 mg, numa única extração; todavia, mais de 60% dos espécimes tinham a capacidade de inocular acima de 40 mg de veneno, aproximadamente o dobro daquela que seria a dose mínima mortal, presuntiva, para um homem de 60 kg. [19]

Apesar dos progressos verificados pelos numerosos estudos sobre as peçonhas ofídicas, desde os primeiros trabalhos encetados por Vital Brazil [8] (1901-17), constatamos, pela literatura consultada, não ter havido preocupação, por parte dos pesquisadores que se dedicam ao assunto, relativa à possível variação da toxicidade da peçonha, tampouco ao índice de sobrevida proporcionado pelas técnicas empregadas para a obtenção da mesma.

Propusemo-nos, face às considerações apresentadas, estudar, inicialmente, a influência dos processos de extração de veneno sobre sua toxicidade e a sobrevida de serpentes das subespécies *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno: Trabalhamos, de acordo com Hoge & Romano [15] (1972), com a mistura de venenos provenientes de dezenas de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) e *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral, 1926), adultos, sem distinção de sexo, procedentes do Estado de São Paulo e de Estados circunvizinhos, extraidos mediante dois processos: compressão manual das glândulas veneníferas e aplicação de uma corrente elétrica de quatro volts sobre o pálato, de acordo com Belluomini [4] (1965).

Todas as amostras foram colhidas na Secção de Venenos do Instituto Butantan, no serviço de rotina, onde as serpentes são mantidas em compartimentos sob temperatura regulada entre 21 a 26°C e grau de

ROLIM-ROSA, R.; BELLUOMINI, H. E.; SILES VILLARROEL, M.; & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:245-251, 1980/81.

umidade entre 40 e 60%, conforme Belluomini [3] (1964). Os venenos eram extraídos quinzenalmente de cada lote — manual e elétrico — colhidos em um cálice e, a seguir, centrifugados. Imediatamente após, o "pool" era submetido à dessecação a vácuo e conservado a 4°C [23, 24].

Soluções de Veneno: O veneno seco era dissolvido em solução de NaCl a 1,5%, conforme Vital Brazil [9], (1911), contendo 200 microgramas por mililitro. Estas soluções eram distribuídas em flaconetes os quais, uma vez hermeticamente fechados, eram conservados em congelador regulado a −25°C, de acordo com técnica adotada por Furlanetto [11] (1965).

No momento da manipulação, cada frasco era descongelado e feitas as diluições seriadas, observando a mesma técnica utilizada por Rolim-Rosa et al [18] (1973) e Bancher et al [2] (1973).

A determinação da atividade tóxica das amostras de peçonha era, inicialmente, norteada por um ensaio preliminar efetuado mediante a inoculação de quantidades variáveis da mesma, segundo uma razão constante igual a 2, ensaio esse que nos colocava a par do grau de toxicidade do veneno [18].

Animais utilizados: Todos os ensaios foram realizados em camundongos — *Mus musculus* Linnaeus 1758 — de 18 a 22 gramas de peso, sem distinção de sexo, provenientes do Biotério Geral do Instituto; as inoculações eram feitas pela via venosa.

Cálculo da DL50 — A DL50 de cada experimento foi sempre calculada com os resultados verificados após 48 horas das inoculações, pelo método de Reed & Müench [17] (1938) e ratificada pelo método prático preconizado por Miller & Tainter [16] (1944), em papel milimetrado em escala "log-probit".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da variação da atividade tóxica dos venenos crotálicos extraidos mediante a aplicação das duas técnicas, manual e elétrica, expressos em termos de DL50, referentes às sucessivas operações, estão consubstanciados nas Tabelas 1 e 2, e o confronto entre ambas, na Tabela 3.

TABELA 1

Variação da atividade tóxica da mistura de venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*, obtidos pelo processo manual, em função da ordem das extrações e do número de serpentes de um mesmo grupo, expressa em valores de DL50 para camundongos de 18 a 22 g, inoculados pela via venosa.

Extrações	Número de Serpentes	DL50 μg	Atividade relativa (1.ª extração = 100)
1.ª	181	3,518	100,00
2.ª	144	3,456	101,79
3.ª	73	3,159	112,07
4.ª	65	3,095	113,67

ROLIM-ROSA, R.; BELLUOMINI, H. E.; SILES VILLARROEL, M.; & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:245-251, 1980/81.

Os resultados expressos pela Tabela 1 revelam que houve oscilação entre os valores da DL50 da 1.ª à 4.ª extrações e que, tomando-se a 1.ª com valor igual a 100%, verifica-se que houve, nas extrações seguintes, aumento gradual e constante da potência relativa da peçonha. Foi tomada a DL50 da primeira extração como referência porquanto as serpentes não haviam recebido alimento, ainda, e o veneno resultante era representativo da quantidade secretada e acumulada pelo ofídio na natureza, procedimento, aliás, já adotado por Biasi et al[6] (1976-77) por ocasião do estudo sobre a produção de veneno de *Bothrops pradoi*. Ainda na Tabela 1 pode-se notar que a quantidade de serpentes, inicialmente em número de 181, reduziu-se a 65 por ocasião da 4.ª extração. Ocorrência análoga já havia sido observada e discutida em trabalhos anteriores[3, 4, 6, 7].

TABELA 2

Variação da atividade tóxica da mistura de venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*, obtidos pelo processo elétrico, em função da ordem de extrações e do número de serpentes de um mesmo grupo, expressa em valores de DL50 para camundongos de 18 a 22 g, inoculados pela via venosa.

Extrações	Número de Serpentes	DL50 μg	Atividade relativa (1.ª extração = 100)
1.ª	138	3,163	100,00
2.ª	118	3,507	90,19
3.ª	94	4,136	76,47
4.ª	36	5,143	61,50

Nota-se, pela Tabela 2, que a toxicidade da peçonha crotálica sofreu decréscimo gradual em sua potência relativa, fenômeno inverso daquele observado na Tabela 1, a qual apresenta resultados conseqüentes ao processo de extração manual.

Paralelamente à diminuição da atividade tóxica da peçonha obtida mediante estímulo elétrico, nota-se uma progressiva redução da quantidade de exemplares a qual, por ocasião da 4.ª extração, estava representada em apenas 26% do número inicial, enquanto que, pelo processo de extração manual, esse índice foi da ordem de 36%.

TABELA 3

Confronto entre as quantidades de DL50/mg da mistura de venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* obtidos pelos processos manual e elétrico, de dois grupos de serpentes, extraidas quinzenalmente, em quatro oportunidades.

Extrações	Quantidade de DL50/mg da mistura de venenos	
	Pela extração manual	Pela extração elétrica
1.ª	284	316
2.ª	289	285
3.ª	318	242
4.ª	323	194
Médias	303	259

ROLIM-ROSA, R.; BELLUOMINI, H. E.; SILES VILLARROEL, M.; & IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:245-251, 1980/81.

Comparando-se o número de DL50 contido em um miligrama da mistura de venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*, obtido mediante extração manual com o número de DL50 do mesmo produto obtido por extração elétrica, verifica-se que, na primeira extração, a peçonha resultante da obtenção através de descarga elétrica apresenta 32 DL50 a mais que aquela obtida pelo processo de extração manual. Todavia, as extrações subseqüentes demonstram uma inversão nos valores da DL50, isto é, os venenos obtidos por extração manual, a partir da 2.ª extração até a 4.ª, aumentaram gradativamente de toxicidade, enquanto os venenos obtidos por estímulo elétrico diminuíram durante as mesmas operações.

Possivelmente, além do processo empregado para as extrações das peçonhas ofídicas, vários outros fatores poderiam causar alterações, tanto na quantidade quanto na qualidade das mesmas, dentre os quais poderíamos destacar os seguinte: — mudança abrupta das condições de vida livre para a vida em cativeiro das serpentes; a alimentação; a idade; as excitações e os traumatismos resultantes das freqüentes e sucessivas extrações, etc...

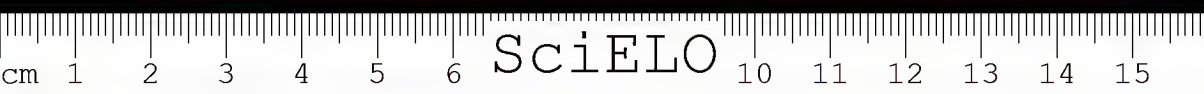
Pelos resultados apresentados, podemos inferir que o processo de extração de peçonha de serpentes das subespécies *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, através de indução elétrica, não seria recomendável para o serviço de rotina de aferição de antissoros, em virtude de se constituir em um recurso que apresenta, como conseqüência, diminuição progressiva na atividade tóxica da referida peçonha e de causar a morte de maior número de exemplares mantidos em cativeiro.

Quer nos parecer que o efeito de sucessivas contrações das glândulas veneníferas, induzidas por descarga elétrica, repercute negativamente sobre a fisiologia das mesmas.

Paradoxalmente, o processo de extração elétrica seria o mais recomendável a ser empregado em serpentes submetidas à primeira extração, por fornecer, não só o produto secretado pela serpente em seu habitat natural, como corresponder ao mais tóxico e, por isso mesmo, poderia ser o mais indicado para aferir a capacidade neutralizante de antissoros correspondentes, em termos de DL50.

CONCLUSÕES

1. A mistura de venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* obtidos de exemplares em cativeiro e extraídos quinzenalmente, apresenta alterações em sua atividade tóxica, na dependência do processo, elétrico ou manual, de obtenção.
2. O processo elétrico, embora apresentasse a peçonha mais ativa, em termos de DL50 para camundongos, na primeira extração, revelou um declínio progressivo nas extrações subseqüentes.
3. O processo manual, não obstante apresentasse a peçonha menos ativa do que aquela obtida na primeira operação elétrica, reve-

lou, pelo mesmo método de aferição, aumento crescente nas extrações subseqüentes.

4. A sobrevida dos espécimes de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* foi, cerca de 10%, maior nos submetidos às extrações manuais.

ABSTRACT: The authors demonstrate that the venom extraction process in snakes of the subespecies *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768), and *Crotalus durissus collilineatus* Amaral 1926, exerts an influence on the toxicity of the final product as well as on the survival of the specimens. The venom firstly obtained by electrical stimulation of glands is more toxic in terms of LD50 for mice intravenously inoculated, while the resulting products of the next extractions showed values in a decreasing scale; an inverse phenomenon was registered with the venoms obtained through manual extraction. As to the survival rate of the snakes submitted to the manual process of venom extraction, it could be verified that there was a 10% difference in its favor in comparison with the process of electric stimulation applied upon the venom glands.

KEYWORDS: Crotalic venom; effects by the extraction process upon the toxicity, and survival rate of the snakes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. *Serpentes do Brasil : iconografia colorida.* 2.ª edição. São Paulo, Melhoramentos/Ed. USP, 1978.
2. BANCHER, W.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular em *Mus. musculus* Linnaeus 1758. *Mem. Inst. Butantan, 37*:139-148, 1973.
3. BELLUOMINI, H.E. Produção de veneno de serpentes em cativeiro. Comparação de resultados entre serpentário exposto e biotério aquecido. *Arq. Inst. Biol.* (São Paulo), *31*:149-154, 1964.
4. BELLUOMINI, H.E. Venom production of snakes in captivity. *Mem. Inst. Butantan, 32*:79-88, 1965.
5. BELLUOMINI, H.E. Extraction and quantities of venom obtained from some brazilian snakes. In BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E., ed. / *Venomous animals and their venoms.* New York, Academic Press, 1968. p. 97-117.
6. BIASI, P.; BELLUOMINI, H.E. & FERNANDES, W. Quantidades de veneno obtidas na extração de serpentes *Bothrops pradoi* (Hoge, 1948). Serpentes *Viperidae, Crotalinae. Mem. Inst. Butantan, 40/41*:155-166, 1976/77.
7. BIASI, P.; BELLUOMINI, H.E.; HOGE, A.R. & PUORTO, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*: 167-172, 1976/77.
8. BRAZIL, V. Do envenenamento ofídico e seu tratamento. Conferência realizada no dia 1.º de dezembro de 1901, na Escola de Farmácia de São Paulo. *Colet. Trab. Inst. Butantan, 1*:31-52, 1901/17.
9. BRAZIL, V. *A defesa contra o ofidismo.* São Paulo, Pocai Weiss, 1911.
10. FONSECA, F. *Animais peçonhentos.* São Paulo, Instituto Butantan, 1949. p. 135-158.
11. FURLANETTO, R.S. Emprego de camundongos tratados com doses preparatórias de venenos botrópicos para avaliação de DL50 desses venenos. São Paulo, 1965. (Tese — Faculdade de Odontologia da USP).

---

12. GONÇALVES, J.M. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. II. *Crotalus durissus crotaminicus*, subespécie biológica. *Anais Acad. bras. Ciênc.*, *28*:365, 1956.

13. HOGE, A.R. Preliminary account on neotropical *Crotalinae* (Serpentes *Viperidae*). *Mem. Inst. Butantan*, *32*:109-184, 1965.

14. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A.R.W. de L. Neotropical pit vipers, sea snakes and coral snakes. In BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E. ed. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, 1971. p. 211-293.

15. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A.R.W. de L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan*, *36*:109-208, 1972.

16. MILLER, L.C. & TAINTER, M.L. Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic probigraph paper. *Pro. Soc. exp. Biol. Med.*, *57*: 261-264, 1944.

17. REED, L.J. & MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* (Baltimore), *27*:493-497, 1938.

18. ROLIM-ROSA, R.; FURLANETTO, S.M.P.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) em *Mus musculus* Linnaeus, 1758. *Mem. Inst. Butantan*, *37*:131-137, 1973.

19. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In VERONESI, R. ed. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 4.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. p. 970-982.

20. ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In BÜCHERL, W. & BUCKLEY, E., ed. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, 1971. p. 345-384.

21. ROSENFELD, G. & BELLUOMINI, H.E. Quantidade de veneno encontrado em serpentes venenosas do Brasil. Dados comparativos para avaliação da mortalidade humana (resumo). I Congresso Brasileiro de Zoologia — Museu Nacional. Rio de Janeiro, 1960.

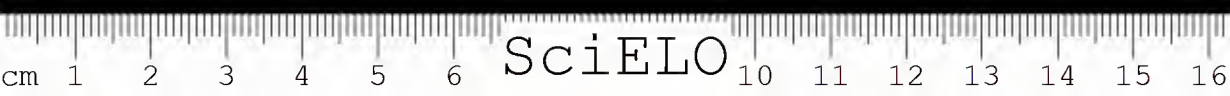
22. SCHENBERG, S. Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan*, *29*:213-226, 1959.

23. SCHOTTLER, W.H.A. On the stability of desiccated snake venoms. *J. Immunol.* (Baltimore), *67*:299-320, 1952.

24. SLOTTA, C.H. & SZYSZKA, G. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. I. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *11*:109-119, 1937.

25. SLOTTA, C.H. & FRAENKEL-CONRAT, H.L. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan*, *12*:505-513, 1938/39.

26. VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. Ass. med. Brasil.*, *26*(6):212-218, 1980.

Mem. Inst. Butantan
44/45:253-258, 1980/81

PRODUÇÃO DE SORO ANTIARACNÍDICO POLIVALENTE MEDIANTE INOCULAÇÕES SIMULTÂNEAS DE VENENOS EM UM MESMO ANIMAL

Raymundo ROLIM ROSA [1]
Medardo SILES VILLARROEL [2]
Elizabete Gomes Jardim VIEIRA [3]
Hideyo IIZUKA [4]
José NAVAS [5]

RESUMO: É descrito um método para a produção, em escala industrial, de soro antiaracnídico polivalente, mediante a inoculação de mistura de venenos de *Tityus serrulatus*, *Phoneutria* spp, *Loxosceles* spp e *Lycosa erythrognatha*. São enfatizadas as suas vantagens técnicas e econômicas, destacando-se, entre outras, o emprego de menor número de animais soro-produtores, os menores dispêndios de imunógenos, de tempo e de trabalho, em relação aos possíveis processos de produção dos respectivos antivenenos específicos.

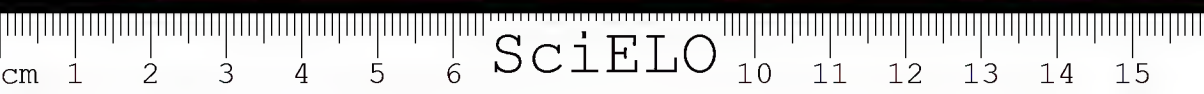
PALAVRAS-CHAVE: Soro antiaracnídico polivalente; produção em escala industrial do soro antiaracnídico polivalente.

INTRODUÇÃO

Nos casos de acidentes aracnídicos, nem sempre é possível ser reconhecido o animal responsável, nem mesmo, de acordo com Rosenfeld e cols. [17] (1957), pelos sinais ou sintomas registrados logo após as picadas. A produção de um imunessoro polivalente capaz de neutralizar seus venenos seria, sob vários aspectos, recomendável.

Diversos autores [1, 2, 3, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19] obtiveram, em relação a determinadas espécies de peçonhas ofídicas, aranêicas e escorpiônicas, pertencentes ao mesmo ou a gêneros diferentes, antivenenos polivalentes mediante inoculações de seus respectivos venenos de forma alternada ou de misturas, em um mesmo animal.

---

1. Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
2. Professor Livre-Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
3. Assistente do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan.
4. Pesquisador Científico Ref. PqC-1 e Encarregado do Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan.
5. Ex-Encarregado do Setor de Imunização do Serviço de Imunologia, do Instituto Butantan.
Endereço para correspondência: Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

Os bons resultados e as reais conveniências demonstrados pelos citados pesquisadores, permitiram-nos propor a obtenção de um produto capaz de neutralizar venenos de artrópodes pertencentes a ordens diferentes — *Scorpiones* e *Araneae* — empregando um esquema de hiperimunização em um mesmo cavalo, utilizando uma mistura dos referidos venenos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Venenos utilizados

Foram utilizados venenos de *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922, de *Phoneutria nigriventer* (Keyserling, 1891) e de *Phoneutria keyserling* (Pickard-Cambridge, 1897) extraídos por descarga elétrica e dessecados a vácuo, segundo técnica de Bücherl [9] (1971), misturados a triturados de glândulas de *Lycosa erythrognatha* Lucas, 1836 e de cefalotórax de *Loxosceles* spp Heinecken & Lowe, 1833.

Os venenos, as glândulas e os cefalotóraxes (cada cefalotórax contém duas glândulas), foram fornecidos pela Seção de Artrópodes Peçonhentos do Instituto Butantan.

2. Determinação da atividade tóxica dos venenos

2.1 *Tityus serrulatus* — Determinada pelo método descrito por Brazil [5] (1918).

2.2 *Lycosa erythrognatha* — Observando o método proposto por Brazil & Vellard [7] (1950).

2.3 *Loxosceles* spp — Conforme método preconizado por Furlanetto [15] (1961).

2.4 *Phoneutria* spp — Embora não conste da literatura, o Instituto Butantan determina a atividade tóxica destes venenos, em cobaias de 375 g ± 25 g, sem distinção de sexo, inoculadas pela via subcutânea e observadas por 48 horas.

3. Produção de soros antiaracnídicos monovalentes

Para as necessárias comparações com os resultados obtidos, estão apresentadas no Quadro 1, as quantidades de imunógenos e o número de dias necessários para a produção de soros antiaracnídicos monovalentes, segundo método anteriormente utilizado pelo Instituto Butantan, empregando um adjuvante oleoso acrescentado às últimas doses do esquema de hiperimunização.

QUADRO I

Imunessoros Específicos

Venenos	Hiperimunização de Base		Reimunização	
	mg ou gls	n.º de dias	mg ou gls	n.º de dias
Phoneutria spp	63,0 mg	49	57,0 mg	28
T. serrulatus	135,0 mg	28	75,0 mg	28
L. erythrognatha	720,0 gls	63	600,0 gls	14
Loxosceles spp	546,0 gls	91	350,0 gls	14

4. Mistura imunogênica e adjuvante utilizados para a produção de soro antiaracnídico polivalente

4.1 Mistura imunogênica — Para um volume de 300,0 ml, os componentes entraram nas seguintes proporções:

Componentes	mg	glândulas	ml
Phoneutria spp	300,0	—	—
T. serrulatus	300,0	—	—
L. erythrognatha	—	300,0	—
Loxosceles spp	—	900,0	—
Glicerina	—	—	120,0
Thimerosal 1/1000	—	—	60,0
Sol. Fisiológica a 0,85% q.s.p.	—	—	300,0

4.2 Adjuvante utilizado — Foi utilizado o adjuvante de Freund: completo com a primeira dose de imunógenos e incompleto com a segunda.

5. Animais soro-produtores utilizados e esquemas de hiperimunização e de reimunização

5.1 Foram hiperimunizados 10 cavalos machos, castrados, de idade entre 4 e 10 anos, pesando de 380 a 430 kg, jamais utilizados para a produção de soros hiperimunes.

5.1.1 Hiperimunização de Base — Todas as doses foram inoculadas pela via subcutânea, na região dorsal.

1.ª dose — 6,0 ml da mistura de venenos adicionados a 10 ml de adjuvante de Freund completo e inoculados em 8 pontos diferentes;

2.ª dose — 6,0 ml da mistura de venenos adicionados a 10 ml de adjuvante de Freund incompleto e inoculados em 8 outros diferentes pontos;

3.ª dose — 3,0 ml da mistura de venenos adicionados a 15 ml de solução fisiológica a 0,85% e inoculados, em três etapas espaçadas de duas horas, em torno dos granulomas formados pelas doses anteriores.

As demais doses, 4.ª e 5.ª, foram iguais à terceira.

Foram observados intervalos de 7 dias entre as três primeiras doses e de dois dias entre as restantes.

5.1.2 Reimunização — Após 30 dias, a contar do último dia de sangria (item 6.2), os animais foram submetidos à reimunização, recebendo doses imunogênicas correspondentes às três últimas da hiperimunização de base, pela mesma via e na mesma região.

6. Sangrias

6.1 Sangria de prova — Consistia na retirada, por punção da jugular, de cerca de 20 ml de sangue, de cada animal separadamente, recolhidos em tubos de ensaio sem anticoagulante. Esta operação era realizada 7 dias após a inoculação da última dose de antígeno.

6.2 Sangria final — Equivalente a 3%, em volume de sangue, do peso de cada cavalo, efetuada em duas etapas com intervalo de 48 horas entre as mesmas. O sangue era recebido em tubos contendo solução de citrato de sódio a 17%, na proporção de 10% em relação ao volume de sangue a ser obtido.

A separação do plasma era realizada logo após a sangria, em desnatadeira tipo Alfa Laval, adaptada para essa finalidade.

7. Determinação da capacidade neutralizante dos antivenenos

A capacidade neutralizante de cada fração de antiveneno correspondente a cada imunógeno contido na mistura, foi determinada segundo os métodos descritos no item 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os soros antiaracnídicos produzidos pelo Instituto Butantan, durante muitos anos, foram obtidos através de hiperimunizações específicas, com exceção do soro antictênico-licósico, então produzido mediante hiperimunizações de cavalos com uma mistura de venenos de *Phoneutria* spp e *Lycosa erythognatha.*

A aplicação do método ora proposto possibilitou a produção de um imunessoro polivalente, capaz de neutralizar os venenos aranêicos e escorpiônico estudados. Para a sua produção, foram consumidas quantidades relativamente pequenas de venenos, conforme demonstra a Tabela 1.

TABELA 1

Quantidades de venenos secos ou de número de glândulas utilizadas para a hiperimunização de base e para a reimunização de cada cavalo, para a produção de soro antiaracnídico polivalente, com respectivos títulos mínimos detectados.

Venenos	Hiperimunização de base (18 dias)	Reimunização (4 dias)	Título mínimo detectado do antiveneno
Phoneutria spp	21,0 mg	9,0 mg	300 µg/ml *
T. serrulatus	21,0 mg	9,0 mg	400 µg/ml *
L. erythrognatha	21,0 gls	9,0 gls	2.000 µg/ml **
Loxosceles spp	63,0 gls	27,0 gls	15 µg/ml **

* Atividade antitóxica

** Atividade antinecrosante

Se confrontarmos quantidades de antígenos e tempo dispendidos entre a produção de soros antiaracnídicos específicos (Quadro 1, Material e Métodos) com o antiveneno polivalente ora produzido, podemos constatar considerável diminuição das necessidades de animais soro-produtores, de venenos e de tempo destinados à hiperimunização.

Considerando que um exemplar de *Phoneutria* spp produz em média, numa extração, 1,25 mg[10] de veneno, conclui-se que foram poupadas, aproximadamente, 34 aranhas; 699 glândulas de *L. erythrognatha* correspondem, praticamente, a 350 exemplares que foram dispensados pelo método de produção de soro antiaracnídico polivalente; da mesma forma, 483 glândulas de *Loxosceles* spp correspondem a 241, 5 indivíduos poupados e, finalmente, 114 mg de veneno de *T. serrulatus* que seriam produzidos por cerca de 184 escorpiões, sabendo-se que cada exemplar desta espécie produz, em média, por extração, 0,62 mg de veneno seco [10].

De forma semelhante, efetuando-se a mesma análise comparativa entre as hiperimunizações de base, constata-se que as reimunizações exigiram menores quantidades de venenos e de tempo, ou seja, 38 exemplares de *Phoneutria* spp; 296 de *L. erythrognatha;* 162 de *Loxosceles* spp e de 106 escorpiões da espécie *T. serrulatus.*

CONCLUSÕES

1. É viável a produção, num mesmo animal e em escala industrial, de um imunessoro capaz de neutralizar, simultaneamente, os venenos de *Tityus serrulatus*, *Phoneutria* spp, *Lycosa erythrognatha* e *Loxosceles* spp.

2. O método utilizado permitiu sensível economia de animais soro-produtores, de imunógenos e de tempo, para a obtenção de títulos neutralizantes satisfatórios, tanto nas hiperimunizações de base quanto nas reimunizações.

ABSTRACT: A method is described for the industrial scale production of a polyvalent antiarachnid serum, by the inoculation of a venom mixture of *Tityus serrulatus*, *Phoneutria* spp., *Loxosceles* spp. and *Lycosa erythrognatha.* The technical and economical superiority is emphasized, with special attention to the utilization of less a number of serum producing animals, minor immunogen expenses, time and effort when compared with the possible production processes of the respective specific antivenins.

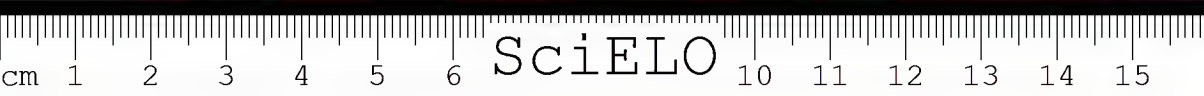
KEYWORDS: Polyvalent antiarachnid serum; large scale production of polyvalent antiarachnid serum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. Do preparo dos soros antipeçonhentos. Emprego de misturas neutras e outros processos usados em Butantan. *Colet. Trab. Inst. Butantan, 2*:85-8, 1918-1924.

2. ARANTES, J. B. & BRANDÃO, C.H. Antígenos e Anticorpos. I. Contribuição ao estudo da dosagem dos soros antibotrópicos polivalentes. *Mem. Inst. Butantan, 21*:153-77, 1949.

3. BRAZIL, V. Do envenenamento ophidico e seu tratamento. Conferência realizada em 1-12-1901. *Colet. Trab. Inst. Butantan, 1*:31-55 (1901, 1917), 1918.

4. BRAZIL, V. *Serumtherapia anti-ophidica.* Mem. apres. 4.º Cong. Latino-Americano, 1909; *Rev. Med. S. Paulo, 12*(15):293-336, 1909.

5. BRAZIL, V. Soro anti-escorpiônico. *Mem. Inst. Butantan*, *1*(1):47-52, 1918.

6. BRAZIL, V. & VELLARD, J. Contribuição ao estudo de veneno de aranhas (1.ª comunicação). *Com. Soc. Biol. e Higiene São Paulo* (Sessão 8-2-1925); *Mem. Inst. Butantan*, *2*:5-78, 1925; *Brazil méd.*, *39*:131, 1925.

7. BRAZIL, V. & VELLARD, J. Imunização intradérmica e por via subcutânea pelo soro anti-ctenus. Método de dosagem e primeira aplicação no homem. *An. paul. Med. Cirurg.*, *60*:555-62, 1950.

8. BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. & ABALOS, J.W. Venenos de las serpientes coral (*Micrurus* SPP): informe sobre um antiveneno polivalente para las Américas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, *84*(2):128-33, 1978.

9. BÜCHERL, W. Novo processo de obtenção de veneno seco, puro de *P. nigriventer* (Keyserling, 1891) e titulação da DL 50 em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *25*(1):153-7, 1953.

10. BÜCHERL, W. Venoms Animals and their venoms — Ed. by Wolfgang Bücherl and Eleanor E. Buckley. Vol. III in *Venomous Invertebrates.* New York, 1971. Academic Press, Chapter *51*:197-277.

11. BÜCHERL, W. Escorpiões e escorpionismo do Brasil. I. Manutenção dos escorpiões em viveiros e extração do veneno. *Mem. Inst. Butantan*, *25*(1): 53-82, 1953.

12. CHRISTENSEN, P.A. The preparation and purification of antivenoms. *Mem. Inst. Butantan*, *33*(1):245-50, 1966.

13. LATIFI, M. & MANHOURI, H. Antivenin Production. *Mem. Inst. Butantan*, *33*(3):893-8, 1966.

14. FURLANETTO, R.S.; SANTOS, N.P. & NAVAS, J. Hiperimunizações anti-crotálica e antibotrópica simultâneas no mesmo animal. *Ciênc. Cult.*, São Paulo, *10*:164-5, 1958.

15. FURLANETTO, R.S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961 (Tese — Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo).

16. OROPEZA, R.M.; GARCIA PEREZ, G. & CALDERON MANES, S. Un nuevo método para la obtención de suero antialacrán. *Rev. Invest. Salud Pub.* (México), *32*:163-71, 1972.

17. ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; de CILO, D.M. & FLEURY, C.T. Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões. *Colet. Trab. Inst. Butantan*, *6*:931-44, 1956-1957. Reprint from: *Atualização terapêutica.* Ed. por Cintra do Prado, F.; Ramos, J. de A. & Ribeiro do Valle, J., Rio de Janeiro, Livraria Luso, Espanhola e Brasileira, 1957.

18. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. *In* Veronesi, R. ed. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 6.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.

19. SAWAI, Y.; KAWAMURA, Y.; OKONOGI, T.; HATTORI, Z.; KATO, I.; SAITO, M. & MUTO, S. Study on the Production of Polyvalent Antivenin Against Seasnake Venoms. *The Snake* (Japan), *9*:63-6, 1978.

Mem. Inst. Butantan
44/45:259-270, 1980/81

ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS DIFERENTES ESQUEMAS DE HIPERIMUNIZAÇÃO EMPREGADOS NA PRODUÇÃO DE SOROS ANTIOFÍDICOS PELO INSTITUTO BUTANTAN (1957-1979)

Raymundo ROLIM ROSA [1]
Elizabete Gomes Jardim VIEIRA [2]
Medardo SILES VILLARROEL [3]
Yara Queiroga SIRACUSA [4]
Hideyo IIZUKA [5]

RESUMO: No transcurso de 22 anos (1957-1979), o Instituto Butantan adotou quatro esquemas de hiperimunização de eqüídeos, diferentes entre si quanto às doses de veneno, dos quais três quanto às doses e o adjuvante: óleo vegetal, alginato de sódio e adjuvante de Freund, respectivamente. No último período de observação, 1975--1979, a introdução do adjuvante de Freund, completo e incompleto, nas misturas imunogênicas reduziu, em cerca de 99%, a quantidade de veneno aplicada e, em aproximadamente 80%, o tempo necessário para a produção de imunessoros com títulos mais altos que os conseguidos durante os primeiros períodos.

PALAVRAS-CHAVE: Soros antiofídicos. Esquemas de hiperimunização de eqüídeos. Adjuvante de Freund na hiperimunização de eqüídeos.

INTRODUÇÃO

Uma das preocupações dos institutos produtores de soroterapêuticos é, sem dúvida, a pesquisa de métodos visando obter imunessoros dotados de títulos satisfatórios [7] com menor dispêndio de antígenos e em menor prazo.

O Instituto Butantan, um dos pioneiros no mundo na produção de soros antiofídicos, tem procurado, desde os trabalhos iniciais de Brazil [3]

1. Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
2. Assistente do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan.
3. Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
4. Diretora do Serviço de Controle e Técnicas Auxiliares e ex-Chefe da Seção de Soros do Instituto Butantan.
5. Pesquisador Científico Ref. PqC-1 e Encarregado do Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan.
Endereço para correspondência: Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

(1901), satisfazer àqueles aspectos ensaiando diferentes esquemas de hiperimunização e novos adjuvantes.

Vital Brazil iniciou suas experiências sobre hiperimunização de animais contra venenos ofídicos, em 1897, conseguindo imunizar cães e cabritos contra "doses formidáveis" de veneno de jararaca e de cascavel. Aplicava "veneno puro em estado fresco, diluído em água esterilizada ou água physiológica, ou secco pela evaporação na estufa a 38.° e dissolvido na occasião de ser empregado" [3].

O método de Vital Brazil demorava, inicialmente, cerca de um ano para imunizar eqüinos, porém, mais tarde, o referido prazo foi, pelo mesmo autor, reduzido pela metade, protegendo-se o animal, preliminarmente, com doses decrescentes de soro antipeçonhento específico, administrado pela via venosa [1].

Amaral [1] (1918/24), utilizava mais de 8,0 gramas de veneno para obter o soro anticrotálico, num prazo superior a quatro meses; o soro antibotrópico monovalente, contra o veneno de *B. jararaca*, ou o polivalente contra os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi* e *B. atrox*, era produzido após três meses, dispendendo um total de 5 a 6 gramas de veneno; o antiofídico era preparado mediante inoculações alternadas de venenos crotálico e botrópico polivalente, recebendo o animal, ao cabo de dois e meio a três meses, 2 a 3 gramas de cada tipo de veneno.

Anos mais tarde, com a introdução de um adjuvante oleoso adicionado às últimas doses, as quantidades de veneno necessárias para a produção de antivenenos dotados de títulos satisfatórios sofreram sensíveis reduções, tanto para a primeira hiperimunização quanto para a reimunização.

Em 1972, introduzimos novo esquema de doses e o alginato de sódio como adjuvante, conseguindo reduzir pela metade o consumo de veneno.

A partir de 1975, baseados em trabalhos realizados por Oropeza e cols. [8] (1972), passamos a adotar o adjuvante de Freund e novo esquema de hiperimunização, tendo sido realizados ensaios preliminares necessários para a adequada adaptação aos venenos de serpentes brasileiras e aos métodos de doseamentos observados pelo Instituto Butantan.

A presente comunicação, estabelecendo uma análise comparativa entre os diversos esquemas de hiperimunização ofídica adotados pelo Instituto Butantan, durante o período de 1957 a 1979, propõe-se a revelar os resultados obtidos com o emprego do alginato de sódio e do adjuvante de Freund, nas misturas imunogênicas de venenos ofídicos do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Esquemas de Hiperimunizações:

Foram estudadas hiperimunizações anticrotálica, antibotrópica, antiofídica [5] (anticrotálica e antibotrópica), antielapídica e, a partir de 1963, o antilaquético.

1.1 Esquema empregado durante o período compreendido entre 1957 e 1962:

1.1.1 Hiperimunização de base

Eram inoculadas de 17 a 19 doses de veneno, em escala crescente, a partir de 0,1 mg até 250,0 mg em cavalos pesando até 300 kg, em um período de 86 dias; em cavalos pesando acima de 300 kg e até 450 kg, inoculavam-se doses até 350,0 mg, em 93 dias e, finalmente, em cavalos pesando acima de 450 kg, inoculavam-se doses até 450,0 mg de veneno, em 100 dias, num total, respectivamente, de 815,8 mg, 1.165,8 mg e 1.615,8 mg. Os intervalos, entre uma dose e a seguinte, variavam de 4 a 7 dias.

Um adjuvante oleoso era adicionado, a partir da 12.ª dose, de forma alternada.

1.1.2 Reimunização

Trinta dias após o último dia de sangria referente à hiperimunização de base, os cavalos eram retomados, de acordo com o seguinte esquema de doses: iniciava-se a reimunização com uma dose de 30,0 mg de veneno, progredindo até a dose de 250,0 mg em cavalos pesando até 300 kg, em um período de 31 dias, num total de 790,0 mg; até a dose de 300,0 mg nos cavalos pesando acima de 300 kg a 450 kg, durante 38 dias, num total de 1.090,0 mg e, finalmente, até a dose de 450,0 mg nos cavalos pesando acima de 450 kg durante 45 dias, num total de 1.540,0 mg de veneno.

Os intervalos observados entre as doses variavam de 5 a 7 dias.

O adjuvante era o mesmo da hiperimunização de base, adicionado a doses alternadas a partir da segunda.

Via de inoculação: Foi sempre utilizada a via subcutânea, em um só ponto para cada dose, na região dorsal dos animais.

Sangria de prova: Tanto na hiperimunização de base quanto na reimunização, as sangrias de prova eram realizadas sete dias após a penúltima inoculação de veneno, momentos antes da aplicação da última dose.

Sangrias finais: Efetuadas sete dias após a última dose de antígeno e representava, tanto após a hiperimunização de base quanto na reimunização, na coleta de um volume de sangue correspondente a 5% do peso do animal, dividida em três parcelas com intervalo de 48 horas entre uma e outra.

1.2 Esquema empregado durante o período compreendido entre os anos de 1963 e 1971:

1.2.1 Hiperimunização de base

Eram inoculadas de 14 a 15 doses de veneno, em escala crescente, a partir de 1,0 mg até 350,0 mg, ou até a dose de 450,0 mg em cavalos que não respondiam com títulos neutralizantes satisfatórios, durante um período de 91 a 98 dias, num total de 1.190,0 mg ou de até 1.614,0 mg de veneno.

Os intervalos observados entre as doses variavam de 4 a 7 dias.

O mesmo adjuvante oleoso, utilizado no primeiro esquema, era adicionado, em doses alternadas, a partir da 6.ª.

1.1.2 Reimunização

Trinta dias após o último dia da sangria final referente à hiperimunização de base, os animais eram reimunizados de acordo com a seguinte escala de doses: 100,0 mg, 200,0 mg e 300,0 mg, juntando-se o adjuvante oleoso apenas à segunda dose.

Os intervalos entre as inoculações eram de sete dias.

Via de inoculação do veneno, sangrias de prova e finais eram as mesmas descritas no esquema referente ao período anterior.

1.3 Esquema empregado durante o período compreendido entre os anos de 1972 e 1974:

1.3.1 Hiperimunização de base

Eram inoculadas 12 doses de veneno, a partir de 1,0 mg até 180,0 mg, em um período de 77 dias, empregando um total de antígeno de 564,0 mg, com exceção dos venenos crotálico e elapídico, os quais eram inoculados em 16 doses, a partir de 0,1 mg até 170,0 mg, durante um período de 105 dias e consumindo um total de 508,3 mg de veneno.

Os intervalos mantidos entre as doses eram, regularmente, de 7 dias.

Como adjuvante introduzimos o alginato de sódio, em solução a 2%, adicionado a todas as doses de veneno.

1.3.2 Reimunização

Os cavalos eram reimunizados 30 dias após o último dia da sangria final, de acordo com o seguinte esquema de doses: 20,0, 40,0, 80,0 e 160,0 mg, com intervalos de 7 dias entre as mesmas.

A todas as doses, era adicionado alginato de sódio, como na hiperimunização de base.

Via de inoculação dos venenos, sangrias de prova e sangrias finais, como nos períodos anteriores.

1.4 Esquema empregado durante o período compreendido entre os anos de 1975 e 1979:

1.4.1 Hiperimunização de base

Eram inoculadas 5 doses de veneno, num total de 16,0 mg, sendo a primeira dose constituída de 5,0 mg de veneno mais adjuvante de Freund completo; a segunda dose constituída de 5,0 mg de veneno mais adjuvante de Freund incompleto e as três últimas doses eram preparadas apenas com a solução de veneno, sendo 2,0 mg cada, num período de 18 dias, sendo os intervalos de 7 dias entre as três primeiras doses e de dois dias entre as demais.

1.4.2 Reimunização

Após um período de descanso de 30 dias, a contar do último dia da sangria final, os animais eram retomados recebendo, nesta fase,

apenas 3 doses de imunógeno sem adjuvante, correspondendo a alíquotas de 2,0 mg de veneno.

Os intervalos entre as inoculações eram de 48 horas.

Via de inoculação: A via de inoculação, a exemplo dos esquemas anteriores, era a subcutânea, sendo que na hiperimunização de base cada uma das duas primeiras doses era injetada em oito pontos diferentes do dorso do animal, enquanto as três últimas eram aplicadas em torno dos granulomas formados pelas duas primeiras. Estas inoculações eram efetuadas em três etapas com duas horas de intervalo.

Sangria de prova: Era realizada sete dias após a injeção da última dose de antígeno.

Sangria final: Era processada dez dias após a última inoculação de veneno e consistia na coleta de um volume de sangue correspondente a 3% do peso do cavalo, realizada em duas etapas com intervalo de 48 horas.

2. Métodos de doseamentos:

As titulações dos soros anticrotálico e antielapídico, nas sangrias de prova, eram feitas pelo método de Dean & Webb [2, 11], variando-se a quantidade de veneno e mantendo-se constante o volume de soro. Os imunessoros antibotrópicos e antilaquético o foram pelo método de Vital Brazil [4].

Após a concentração e purificação dos antivenenos pelo método de Pope [9, 10], modificado por Furlanetto [6] (1961), a titulação dos mesmos era realizada pelo método de Vital Brazil.

Títulos mínimos requeridos nas sangrias de prova, para a sangria final:

Soros	1957/1974	1975/1979
Anticrotálico	0,2 mg/ml	0,5 mg/ml
Antibotrópico	0,6 mg/ml	1,0 mg/ml
Antiofídico	0,2 mg/ml * 0,6 mg/ml **	0,3 mg/ml * 1,0 mg/ml **
Antielapídico	0,2 mg/ml	0,3 mg/ml
Antilaquético	0,6 mg/ml	1,0 mg/ml

* Fração anticrotálica
** Fração antibotrópica

O soro antilaquético passou a ser produzido regularmente, a partir da década de 60.

RESULTADOS

As tabelas 1 e 2 consubstanciam os resultados referentes ao consumo de venenos para a produção de cinco imunessoros, nos quatro diferentes períodos analisados, traduzindo em percentuais os miligramas empregados na hiperimunização de base e na reimunização.

ROLIM-ROSA, R.; VIEIRA, E. G. J.; SILES VILLARROEL, M.; SIRACUSA, Y. Q. & IIZUKA, H. Análise comparativa sobre os diferentes esquemas de hiperimunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957-1979). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:259-270, 1980/81.

TABELA 1

Quantidades de venenos, em miligramas, e respectivos percentuais correspondentes aos quatro esquemas de hiperimunização utilizados durante os períodos de 1957-1962, 1963-1971, 1972-1974 e 1975-1979.

Serviço	Hiperimunização de base							
	1957-1962		1963-1971		1972-1974		1975-1979	
	Venenos em mg	%	Venenos em mg	% *	Venenos em mg	% *	Venenos em mg	% *
Botrópico	1615,8	100	1614	99,89	564	34,91	16	0,99
Crotálico	1615,8	100	1614	99,89	508	31,46	16	0,99
Ofídico	1614,0	100	1614	100,00	564	34,94	16	0,99
Elapídico	1615,8	100	1614	99,89	508	31,46	16	0,99
Laquético	—	—	1614	100,00	564	34,94 **	16	0,99 **

* Percentagens em relação ao primeiro período (1957-1962)

** Percentagens em relação ao segundo período (1963-1971)

TABELA 2

Quantidades de venenos, em miligramas, e respectivos percentuais correspondentes aos quatro esquemas de reimunização utilizados durante os períodos de 1957-1962, 1963-1971, 1972-1974 e 1975-1979.

Serviço	Reimunização							
	1957-1962		1963-1971		1972-1974		1975-1979	
	Venenos em mg	%	Venenos em mg	% *	Venenos em mg	% *	Venenos em mg	% *
Botrópico	1540	100	600	38,96	300	19,48	6	0,39
Crotálico	1540	100	600	38,96	300	19,48	6	0,39
Ofídico	1540	100	600	38,96	300	19,48	6	0,39
Elapídico	1540	100	600	38,96	300	19,48	6	0,39
Laquético	—	—	600	100,00	300	50,00 **	6	1,00 **

* Percentagens em relação ao primeiro período (1957-1962)

** Percentagens em relação ao segundo período (1963-1971)

As Tabelas 3 e 4 apresentam resultados referentes ao número de dias requeridos para as hiperimunizações de base e para as reimunizações, com respectivos percentuais, nos quatro diferentes períodos estudados.

TABELA 3

Número de dias e respectivos percentuais, necessários para a hiperimunização de base, correspondentes aos quatro períodos de 1957-1962, 1963-1971, 1972-1974 e 1975-1979.

Serviço	Hiperimunização de base							
	1957-1962		1963-1971		1972-1974		1975-1979	
	n.º de dias	%	n.º de dias	% *	n.º de dias	% *	n.º de dias	% *
Botrópico	100	100	98	98	77	77,0	18	18,0
Crotálico	100	100	98	98	77	77,0	18	18,0
Ofídico	100	100	98	98	77	77,0	18	18,0
Elapídico	100	100	98	98	77	77,0	18	18,0
Laquético	—	—	98	100	77	78,6 **	18	18,4 **

* Percentagens em relação ao primeiro período (1957-1962)

** Percentagens em relação ao segundo período (1963-1971)

TABELA 4

Número de dias e respectivos percentuais, necessários para a reimunização, correspondentes aos quatro períodos de 1957-1962, 1963-1971, 1972-1974 e 1975-1979.

Serviço	Reimunização							
	1957-1962		1963-1971		1972-1974		1975-1979	
	n.º de dias	%	n.º de dias	% *	n.º de dias	% *	n.º de dias	% *
Botrópico	45	100	14	31,10	21	46,70	4	8,9
Crotálico	45	100	14	31,10	21	46,70	4	8,9
Ofídico	45	100	14	31,10	21	46,70	4	8,9
Elapídico	45	100	14	31,10	21	46,70	4	8,9
Laquético	—	—	14	100,00	21	150,00 **	4	28,6 **

* Percentagens em relação ao primeiro período (1957-1962)

** Percentagens em relação ao segundo período (1963-1971)

As figuras 1 e 2 sintetizam as quantidades de venenos utilizadas nos quatro esquemas de hiperimunização e de reimunização, respectivamente, referentes aos períodos: 1957-1962, 1963-1971, 1972-1974 e 1975-1979.

ROLIM-ROSA, R.; VIEIRA, E. G. J.; SILES VILLARROEL, M.; SIRACUSA, Y. Q. & IIZUKA, H. Análise comparativa sobre os diferentes esquemas de hiperimunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957-1979). *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:259-270, 1980/81.

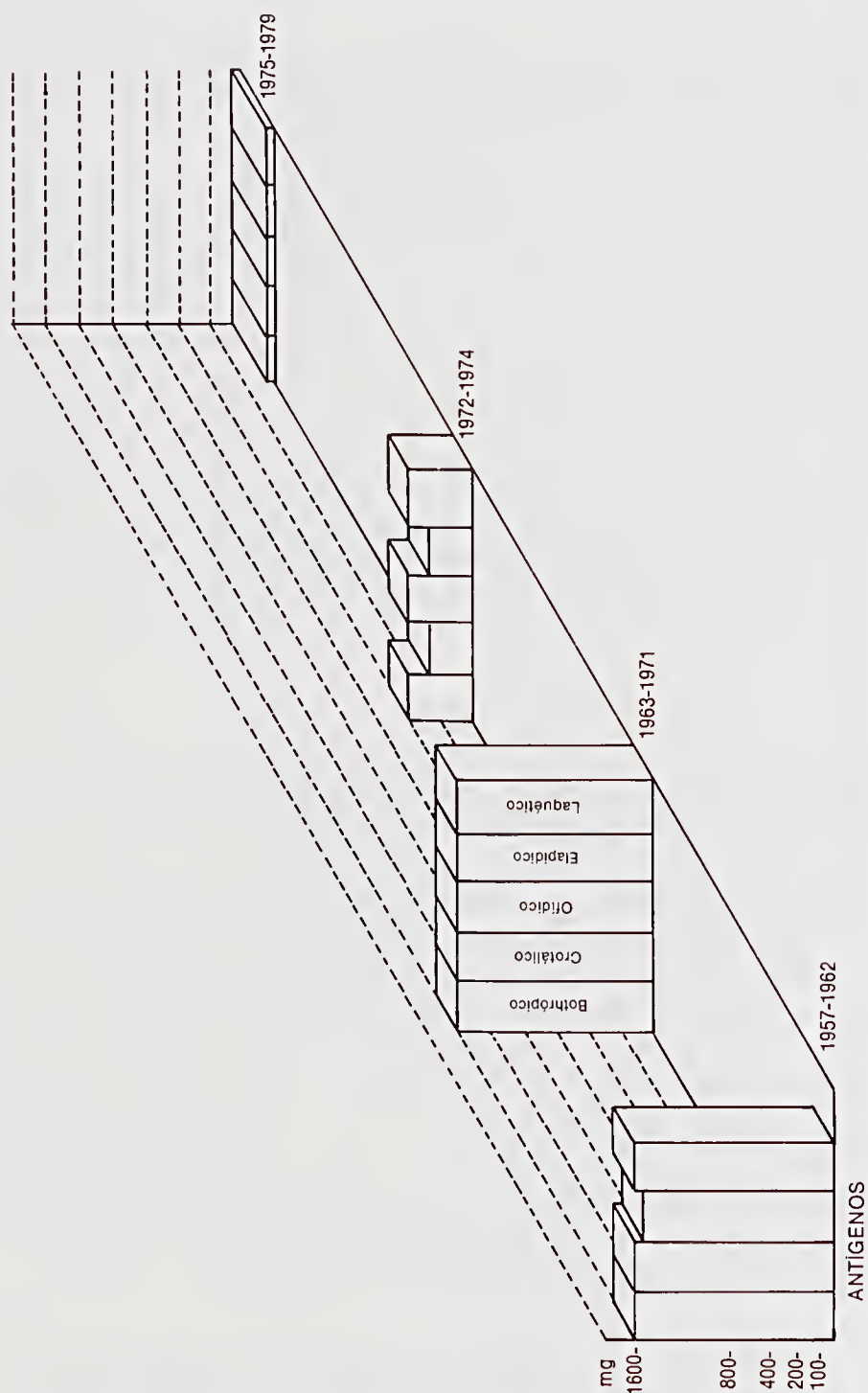



Fig. 1 — Quantidades de venenos, em miligramas, utilizadas na hiperimunização de um eqüídeo, em quatro diferentes períodos.

ROLIM-ROSA, R.; VIEIRA, E. G. J.; SILES VILLARROEL, M.; SIRACUSA, Y. Q. & IIZUKA, H. Análise comparativa sobre os diferentes esquemas de hiperimunização empregados na produção de soros antiofídicos pelo Instituto Butantan (1957-1979). *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:259-270, 1980/81.

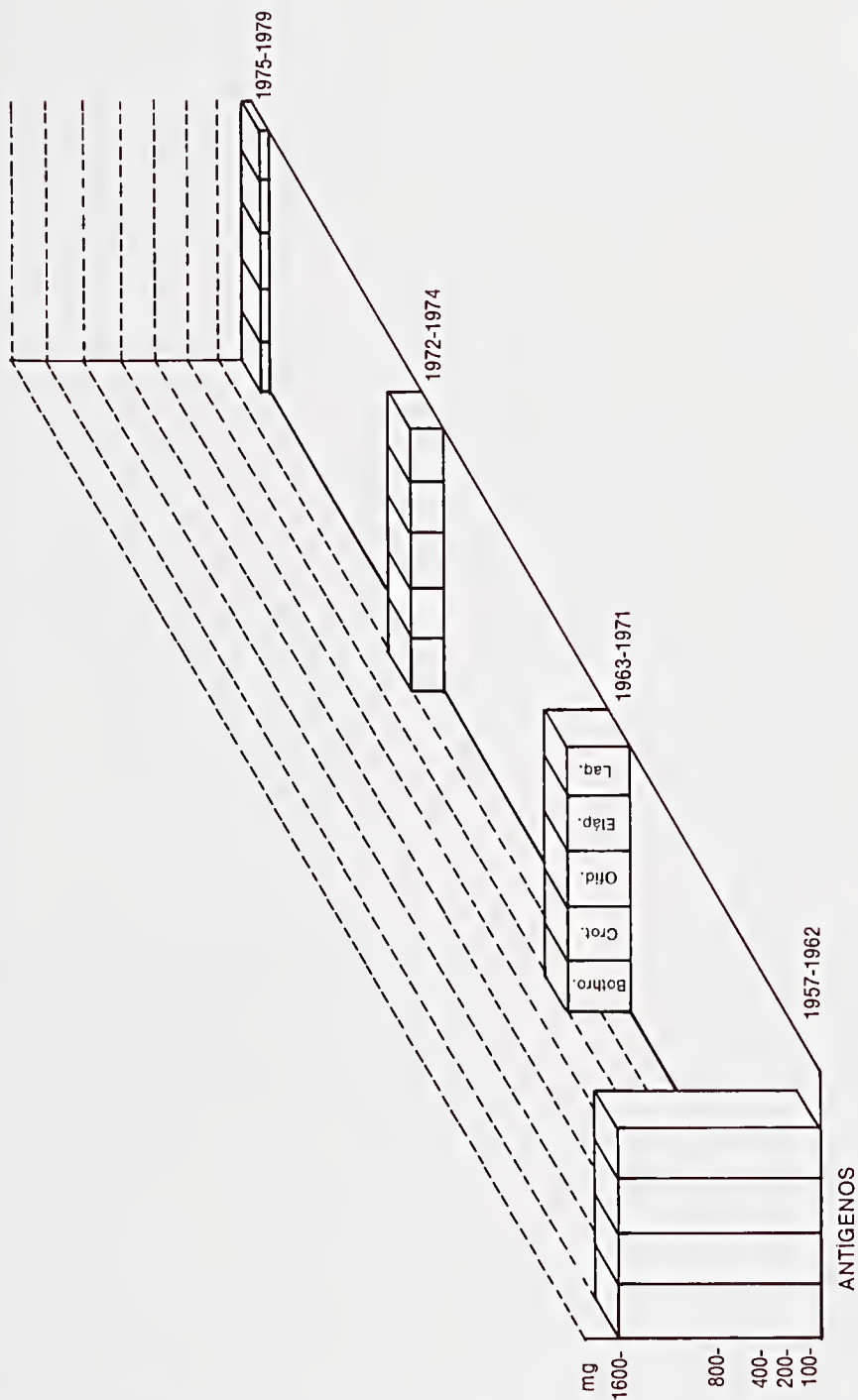



Fig. 2 — Quantidades de venenos, em miligramas, utilizadas na reimunização de um eqüídeo, em quatro diferentes períodos.

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram, claramente, as diminuições progressivas das necessidades de venenos ofídicos e dos prazos requeridos para a produção dos soros antiofídicos, no Instituto Butantan.

Durante o período de 1957 a 1962, as quantidades de venenos necessárias para hiperimunizar eqüídeos variavam em função do peso do animal. Iniciavam-se com a dose de 0,1 mg e terminavam, nos cavalos pesando acima de 450 kg, com a dose de 450,0 mg de veneno, num prazo de 100 dias. A reimunização era efetuada com quantidade de veneno muito próxima da primeira hiperimunização, num prazo equivalente à metade daquele observado anteriormente.

De 1963 a 1971, embora o dispêndio de venenos e tempo para a hiperimunização de base fossem praticamente iguais ao do primeiro período referido acima, a reimunização passou a ser realizada com menos da metade de antígeno e o tempo, de 45 dias, foi reduzido para 14.

O adjuvante utilizado nesses dois citados períodos, isto é, 1957-62 e 1963-71, era constituído de uma mistura oleosa, à base de óleo vegetal, misturado às últimas doses de venenos, alternadamente. Também os títulos considerados mínimos satisfatórios eram os mesmos, isto é: 0,2 mg/ml nas sangrias de prova dos serviços anticrotálico e antielapídico, dosados por floculação, e 0,6 mg/ml para os serviços antibotrópico, antilaquético e para a fração antibotrópica do soro antiofídico.

Um novo adjuvante, solução de alginato de sódio a 2%, utilizado a partir de 1972 até 1974, permitiu que o gasto de veneno, por animal, representasse menos da metade daquele referente aos períodos anteriores quando da primeira hiperimunização e, justamente a metade quando da reimunização; todavia, nesta, o prazo aumentou de 14 para 21 dias. Os títulos considerados satisfatórios eram os mesmos exigidos nos períodos anteriores.

A partir de 1975, passamos a empregar o adjuvante de Freund completo misturado à primeira dose, incompleto à segunda e às três últimas doses, apenas a solução de veneno. A reimunização era realizada apenas com três doses idênticas às últimas da primeira hiperimunização. Este processo propiciou marcante economia de venenos ofídicos e de tempo para a produção dos antivenenos. Em relação aos primeiros dois métodos, a quantidade de veneno passou a ser, aproximadamente, cem vezes menor e o tempo, cerca de cinco vezes menos. Este fato assumiu características mais flagrantes quando da reimunização dos animais. As quantidades de veneno utilizadas foram cerca de 250 vezes menores (1.540,0 mg e 6,0 mg, respectivamente). Em conseqüência, foram obtidas consideráveis economias de venenos, de tempo e maior rendimento dos animais soro-produtores. Paralelamente, foi observada acentuada diminuição das reações locais, nos pontos de inoculação dos antígenos: não mais ocorreram grandes abscessos e necroses de pele e tecidos subjacentes, como eram relativamente comuns nos períodos anteriores, fatores responsáveis pelos freqüentes atrasos nas hiperimunizações.

Os títulos mínimos considerados satisfatórios, após a introdução do adjuvante de Freund, passaram a ser 0,5 mg/ml nas sangrias de prova

do serviço anticrotálico, 0,3 mg/ml no serviço antielapídico, 0,3 mg/ml na fração anticrotálica do soro antiofídico e 1,0 mg/ml para os serviços antibotrópico, antilaquético e na fração antibotrópica do soro antiofídico.

Por outro lado, quando comparativamente utilizamos o esquema de hiperimunização adotado pelo Departamento de Sueros Hiperimmunes, del Instituto Nacional de México [8], não obtivemos, com os venenos por nós utilizados, imunessoros com títulos satisfatórios, aferidos pelas técnicas observadas pelo Instituto Butantan.

CONCLUSÕES

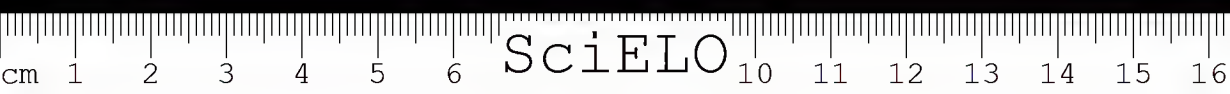
1. Dentre os três adjuvantes utilizados pelo Instituto Butantan, ou sejam mistura oleosa, alginato de sódio e adjuvante de Freund, este último ofereceu melhores e mais significativas conveniências na produção de soros antiofídicos;
2. o adjuvante de Freund propiciou uma economia de venenos da ordem de cem vezes, em relação ao processo de hiperimunização de eqüídeos anticrotálica, antibotrópica, antilaquética e antielapídica, empregado de 1957 a 1971;
3. o tempo necessário para a hiperimunização de base com o adjuvante de Freund, foi cerca de seis vezes menor em relação ao tempo requerido nos períodos de 1957-62 e 1963-71 e de cerca de dez vezes na reimunização;
4. as quantidades de venenos utilizadas para as reimunizações, com o adjuvante de Freund, foram cerca de 250 vezes menores em relação ao emprego de venenos do período 1957-62;
5. os títulos mínimos satisfatórios foram ampliados, após o uso do adjuvante de Freund.

ABSTRACT: In the course of 22 years (1957-1979), the Instituto Butantan adopted 4 methods for the hyperimmunization of equines, differing among themselves as to doses, and three methods as to doses and adjuvant: vegetal oil, natrium alginate and Freund's adjuvant respectively. During the last observation period, i.e., 1975-1979, the introduction of Freund's adjuvant, complete and incomplete, into the immunogenic mixture, reduced about 99% the venom quantity to be applied, and about 80% of the time necessary for the production of immune sera with titers higher than those obtained before.

KEYWORDS: Antiophidic sera. Methods for equine hiperimmunization. Freund's adjuvant in the equine hiperimmunization.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. Do preparo dos Soros Antipeçonhentos. *Colet. Trab. Inst. Butantan*, *2*:85-8, 1918.
2. ARANTES, J.B.; KARMANN, G. & BIER, O.G. Emprego da reação de floculação específica na dosagem do antiveneno crotálico. *Mem. Inst. Butantan*, *28*:21-6, 1944/45.

3. BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. *Rev. Med. de São Paulo, 21*:375-80, 1901.
4. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ª ed. São Paulo, Gráf. Siqueira, 1959.
5. FURLANETTO, R.S.; SANTOS, N.P. & NAVAS, J. Hiperimunizações, Anticrotálica e Antibotrópica, simultâneas no mesmo animal. *Ciênc. Cult.* (São Paulo), *10*(3):164-5, 1958.
6. FURLANETTO, R.S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. p. 64-5 /Tese — Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de S. Paulo/.
7. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Ser. Inf. Tecn.* (Ginebra), *463*, 1971.
8. OROPEZA, R.M.; GARCIA PEREZ, G. & CALDERÓN MANES, S. Esquema Modificado para la Obtención de Sueros Antiofídicos. *Rev. Invest. Salud Pública (México)*: *32*(¾): 179-86, 1972.
9. POPE, C.G. Disagregation of proteins by enzymes. *Brit. J. exp. Path., 19*: 245-51, 1938.
10. POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Brit. J. exp. Path., 20*:201-12, 1939.
11. VAZ, E. & PEREIRA, A. Doseamento do soro anticrotálico por floculação. *An. Inst. Pinheiros, 7*(13):3-26, 1944.

Mem. Inst. Butantan
44/45:271-279, 1980/81

VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE TÓXICA DE VENENOS CROTÁLICOS E DA CAPACIDADE NEUTRALIZANTE DOS ANTIVENENOS ESPECÍFICOS, EM CAMUNDONGOS

Medardo SILES VILLARROEL [1]
Raymundo ROLIM ROSA [2]
Flávio ZELANTE [3]
Walter BANCHER [4]
Helena Maria PIOTO [5]

RESUMO: Os autores compararam, em camundongos, a eficiência das vias intraperitoneal e intravenosa na determinação da atividade tóxica de venenos crotálicos crotamino-positivos e crotamino-negativos. Verificaram a validade do uso de ambas as vias, tendo a intraperitoneal se revelado mais sensível. O mesmo modelo experimental demonstrou ser eficiente para o doseamento dos antivenenos específicos, não sendo observadas diferenças relativas às vias de inoculação. Todavia, nas reações cruzadas, o antiveneno crotálico crotamino-positivo demonstrou maior capacidade neutralizante do que o crotamino-negativo. Este fato sugere o emprego do veneno crotamino-positivo para o preparo e doseamento dos antivenenos de *Crotalus durissus terrificus* do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Venenos e antivenenos crotálicos — Titulação de venenos e antivenenos, em camundongos.

INTRODUÇÃO

A atividade do veneno crotálico, predominantemente neurotóxica e nefrotóxica [10, 11, 18], ainda é determinada, segundo preconiza a Farmacopéia Brasileira [3] (1977), pelo método de Vital Brazil [2] (1907). Conseqüente-

1. Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

2. Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan, Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3. Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

5. Técnica de Laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

mente, o mesmo critério é aplicado para a titulação do antiveneno respectivo.

Siles Villarroel [13] (1977), Siles Villarroel e cols. [14, 15, 16, 17], trabalhando com venenos botrópicos e elapídicos, propuseram a substituição daquele método, demonstrando as vantagens do emprego do camundongo e das vias intraperitoneal e intravenosa, conforme o caso, para as inoculações.

Em relação ao veneno crotálico, algumas observações já foram realizadas por Kocholaty e cols. [6] (1968) e Kocholaty e cols. [7] (1971), que utilizaram camundongos e as vias intraperitoneal e intravenosa, para a inoculação de venenos de *C. durissus durissus* e *C. durissus terrificus*. Concluíram que a via intravenosa revela melhor ação do veneno do que a intraperitoneal. Por outro lado, Bolaños [1] (1972), verificando a toxicidade do veneno de *Crotalus durissus durissus* da América Central, também utilizou camundongos e aquelas duas vias de inoculação. Observou, ao contrário, que a via intraperitoneal evidencia maior suscetibilidade do animal ao veneno inoculado.

Aparentemente, existe uma discrepância entre os dois resultados; todavia, em seus trabalhos, esses autores não forneceram maiores informações sobre a composição do veneno empregado.

Rolim Rosa e cols. [9] (1973), entre nós, empregaram camundongos que receberam veneno de *Crotalus durissus terrificus*, crotamino-positivo, pela via intravenosa. A crotamina confere ao veneno crotálico crotamino-positivo, propriedades bioquímicas e farmacológicas diferentes daquele negativo, estando esta diferença de composição diretamente relacionada com a distribuição geográfica das serpentes.

Na ausência de informações a respeito, procuramos verificar se ocorrem variações na toxicidade dos dois tipos de venenos de *Crotalus durissus terrificus* — crotamino-positivo e crotamino-negativo — segundo as vias de inoculação. Como observações complementares, aplicamos, também, o mesmo modelo experimental para o doseamento dos antivenenos específicos e nas reações de neutralização cruzada.

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno crotálico

Foram utilizados venenos de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti 1768), crotamino-positivos e crotamino-negativos, obtidos por extração manual de diversos animais adultos, dessecados à vácuo e mantidos em geladeira a ± 4°C. Quando de seu emprego, foram feitas soluções concentradas a 1% em solução de NaCl a 0,85% das duas espécies de venenos. A partir destas, foram preparadas todas as demais diluições utilizadas nos ensaios.

Prova para a detecção de crotamina

A crotamina foi verificada conforme Schenberg [12] (1959), através de prova "in vivo".

Antiveneno crotálico

Os antivenenos específicos, obtidos em cavalos hiperimunizados pela primeira vez, foram purificados e concentrados segundo o método de Pope modificado[4] e utilizados obedecendo aos critérios adotados em trabalhos anteriores[13, 15, 17].

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos brancos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), pesando 20,0 g ± 2,0 g, procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, que receberam inoculações pelas vias intravenosa e intraperitoneal, num volume de 0,5 e 1,0 ml, respectivamente. Em todos os ensaios, foram utilizados lotes de seis animais por dose, sem distinção de sexo. Após as inoculações, esses animais foram observados aos 10, 30 e 60 minutos, às 24 e 48 horas. A toxicidade dos venenos foi determinada em termos de DL_{50}, segundo o método de Reed & Müench[8] (1938).

RESULTADOS

Para facilitar a realização dos ensaios, previamente foram determinadas as zonas de toxicidade dos venenos crotamino-positivos e crotamino-negativos, inoculados pelas vias intravenosa e intraperitoneal. De posse desses informes, foram, então, determinadas as respectivas DL_{50}. As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados observados com o veneno crotamino-positivo, quando inoculado pelas vias intravenosa e intraperitoneal, respectivamente.

TABELA 1

Determinação da DL_{50} do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (crotamino-positivo) inoculado, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	2,40	2,88	3,46	4,15	5,00	6,00	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6	6/6	3,67 μg
48 horas	0/6	0/6	3/6	4/6	—	—	3,67 μg

TABELA 2

Determinação da DL_{50} do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (crotamino-positivo) inoculado, por via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas					
	2,00	2,60	3,38	4,39	5,71	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	1/6	1/6	4/6	6/6	6/6	3,01 μg
48 horas	1/6	1/6	4/6	—	—	3,01 μg

As tabelas 3 e 4 apresentam os resultados observados para o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, crotamino-negativo, também inoculado pelas duas vias.

TABELA 3

Determinação da DL_{50} do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (crotamino-negativo) inoculado, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	2,40	2,88	3,46	4,15	5,00	6,00	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	1/6	2/6	5/6	6/6	6/6	3,63 μg
48 horas	0/6	1/6	2/6	5/6	—	—	3,63 μg

TABELA 4

Determinação da DL_{50} do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (crotamino-negativo) inoculado, pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	1,56	2,00	2,60	3,38	4,39	5,71	DL_{50}
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	3/6	3/6	4/6	5/6	6/6	2,60 μg
48 horas	0/6	3/6	3/6	4/6	5/6	—	2,60 μg

As tabelas 5 e 6 referem-se aos doseamentos dos antivenenos crotamino-positivos e, as tabelas 7 e 8, aos antivenenos crotamino-negativos, inoculados pelas vias intravenosa e intraperitoneal, respectivamente.

TABELA 5

Doseamento do antiveneno crotamino-positivo de *Crotalus durissus terrificus* (0,25 ml), aferido frente ao veneno específico (DL_{50} = 3,67 μg); mistura inoculada, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Veneno de *C. d. terrificus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,1	0,01	0,24	37°C	0/6	0/6
0,2	0,02	0,23		0/6	0/6 *
0,3	0,03	0,22	x	2/6	2/6
0,4	0,04	0,21	30 min.	3/6	3/6
0,5	0,05	0,20		4/6	5/6

* Título: 1 ml de antiveneno crotamino-positivo de *C. d. terrificus* neutraliza completamente 1,6 mg ou 436,0 DL_{50} do veneno específico.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H. M. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:271-279, 1980/81.

TABELA 6

Doseamento do antiveneno crotamino-positivo de *Crotalus durissus terrificus* (0,5 ml), aferido frente ao veneno específico (DL_{50}= 3,01 μg); mistura inoculada pela via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos.

Veneno de *C. d. terrificus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,3	0,03	0,47	37°C	0/6	0/6
0,4	0,04	0,46		0/6	0/6 *
0,5	0,05	0,45	x	2/6	2/6
0,6	0,06	0,44	30 min.	3/6	3/6
0,7	0,07	0,43		4/6	4/6

* Título: 1 ml de antiveneno crotamino-positivo de *C. d. terrificus* neutraliza completamente 1,6 mg ou 531,5 DL_{50} do veneno específico

TABELA 7

Doseamento do antiveneno crotamino-negativo de *Crotalus durissus terrificus* (0,25 ml), aferido frente ao veneno específico (DL_{50}= 3,63 μg); mistura inoculada, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Veneno de *C. d. terrificus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,2	0,02	0,23	37°C	0/6	0/6
0,3	0,03	0,22		0/6	0/6 *
0,4	0,04	0,21	x	5/6	6/6
0,5	0,05	0,20	30 min.	6/6	—
0,6	0,06	0,19		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno crotamino negativo de *C. d. terrificus* neutraliza completamente 2,4 mg ou 661,2 DL_{50} do veneno específico.

TABELA 8

Doseamento do antiveneno crotamino-positivo de *Crotalus durissus terrificus* (0,5 ml), aferido frente ao veneno específico (DL_{50}= 2,60 μg); mistura inoculada, pela via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos.

Veneno de *C. d. terrificus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,5	0,05	0,45	37°C	0/6	0/6
0,6	0,06	0,44		0/6	0/6 *
0,7	0,07	0,43	x	1/6	2/6
0,8	0,08	0,42	30 min.	5/6	5/6
0,9	0,09	0,41		5/6	6/6

* Título: 1 ml de antiveneno crotamino-negativo de *C. d. terrificus* neutraliza completamente 2,4 mg ou 923,0 DL_{50} do veneno específico.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H. M. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:271-279, 1980/81.

Com o objetivo de estabelecer análises comparativas entre as capacidades neutralizantes dos dois antivenenos, foram conduzidos os ensaios de neutralização cruzada constantes das tabelas 9 e 10.

TABELA 9

Doseamento do antiveneno crotamino-positivo de *Crotalus durissus terrificus* (0,25 ml), aferido frente ao veneno crotamino-negativo de *C. d. terrificus* (DL_{50}= 3,63 μg); mistura inoculada, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Veneno de *C. d. terrificus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,4	0,04	0,21	37ºC	0/6	0/6
0,5	0,05	0,20		0/6	0/6
0,6	0,06	0,19	x	0/6	0/6 *
0,7	0,07	0,18	30 min.	6/6	—
0,8	0,08	0,17		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno crotamino-positivo de *C. d. terrificus* neutraliza completamente 4,8 mg ou 1.322,3 DL_{50} do veneno crotamino-negativo de *C. d. terrificus*

TABELA 10

Doseamento do antiveneno crotamino-negativo de *Crotalus durissus terrificus* (0,25 ml) aferido frente ao veneno crotamino-positivo de *C. d. terrificus* (DL_{50}= 3,67 μg); mistura inoculada pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Veneno de *C. d. terrificus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,1	0,01	0,24	37ºC	0/6	0/6
0,2	0,02	0,23		0/6	0/6 *
0,3	0,03	0,22	x	1/6	1/6
0,4	0,04	0,21	30 min.	2/6	2/6
0,5	0,05	0,20		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno crotamino-negativo de *C. d. terrificus* neutraliza completamente 1,6 mg ou 436,0 DL_{50} do veneno crotamino-positivo de *C. d. terrificus*

DISCUSSÃO

A exemplo do que demonstráramos anteriormente com relação aos venenos botrópico e elapídico, neste trabalho constatamos que os camundongos também se prestam, satisfatoriamente, para a determinação da toxicidade dos venenos crotálicos.

As DL_{50} determinadas através das inoculações intravenosa e intraperitoneal, apresentaram valores bastante próximos entre si, embora esta última via tivesse determinado uma suscetibilidade do animal, ligeiramente superior. A presença de crotamina, nos pareceu não influir, de forma marcante, na atividade tóxica do veneno.

Em todos os ensaios realizados, as mortes ocorreram a partir de 60 minutos, evoluindo com a progressão das doses. Por outro lado, em nenhuma oportunidade ocorreram mortes após as primeiras 24 horas.

Estas observações nos permitem recomendar o emprego de camundongos como animal de prova e as vias intravenosa e intraperitoneal, indistintamente, como vias de inoculação para a determinação da toxicidade dos venenos crotálicos, quer sejam ou não dotados de crotamina. Para efeito de uniformidade com as observações anteriores [13, 14, 17], seria recomendável a adoção da via intraperitoneal.

As duas vias de inoculação também permitiram o doseamento dos antivenenos específicos (crotamino-positivo e crotamino-negativo), sem que fossem observadas variações entre os resultados.

Em todos os ensaios realizados, as mortes ocorreram sempre a partir de 60 minutos da inoculação, prolongando-se até as 48 horas.

A fim de ser mantida a uniformidade de critérios e tendo em vista estes resultados, recomendamos, também, que o período de observação dos animais inoculados somente com o veneno, seja prolongado até as 48 horas.

Devido à equivalência constatada nos resultados das reações de soroneutralização específica, as provas cruzadas foram realizadas apenas através da via intravenosa.

Enquanto na reação entre veneno e antiveneno crotamino-positivo o título neutralizante determinado foi de 1,6 mg/ml (Tabela 5), na reação cruzada antiveneno crotamino-positivo e veneno crotamino-negativo, o título neutralizante foi três vezes maior ou seja, 4,8 mg/ml (Tabela 9). Quando comparado o resultado entre a reação do antiveneno crotamino-negativo e veneno específico (2,4 mg/ml: tabela 7) com o resultado da reação entre o mesmo antiveneno e o veneno crotamino-positivo, observa-se um efeito neutralizante menor (1,6 mg/ml: tabela 10). Estas verificações sugerem que, para efeito de preparo e doseamento de antivenenos crotálicos, devem ser utilizados os venenos crotamino-positivos, visto que os imunessoros correspondentes neutralizaram, satisfatoriamente, os venenos crotamino-negativos, enquanto que a recíproca ocorre em sentido contrário.

CONCLUSÕES

1. É possível a determinação da atividade tóxica dos venenos de *Crotalus durissus terrificus*, crotamino-positivo e crotamino-negativo, em termos populacionais, através da inoculação intraperitoneal ou intravenosa, em camundongos;
2. o mesmo modelo experimental demonstrou ser adequado para o doseamento dos antivenenos específicos;
3. nas reações cruzadas, o antiveneno crotamino-positivo revelou maior título neutralizante do que o antiveneno crotamino-negativo.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H. M. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:271-279, 1980/81.

ABSTRACT: The authors compare in mice the efficiency of intraperitoneal and intravenous routes for the determination of the toxic activity of crotamin-positive and crotamin-negative crotalic venoms. The validity of both routes was verified, the intraperitoneal, however, proving to be more sensitive. The same experimental model demonstrated its efficiency in dosing specific antivenins, and no differences were observed in relation to the inoculation routes. However, with cross-reaction, the crotamin-positive crotalic antivenin showed a higher neutralizing capacity than the crotamin-negative one. This fact suggests the employment of the positive-crotamin venom for the preparation and dosing of Brasilian *Crotalus durissus terrificus* antivenin.

KEY-WORDS: Crotalic venoms and antivenins. Titration of venoms and antivenins in mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLAÑOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Amer. j. trop. Med. Hyg., 21*:360-3, 1972.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor anti-tóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo, 10*:457-62, 1907.
3. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ª ed., São Paulo, Organização Andrei Editora S.A., 1977.
4. FURLANETTO, R.S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoseélico.* São Paulo, 1961. p-64-5. /Tese — Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo/.
5. GONÇALVES, J.M. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. II. *Crotalus durissus crotaminicus*, subespécie biológica. *Anais Acad. bras. Ciênc., 28*:365, 1956.
6. KOCHOLATY, W.F.; BILLINGS, T.A.; ASHLEY, B.D.; LEDFORD, E.B. & GOETZ, J.C. Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. *Toxicon, 5*:165-70, 1968.
7. KOCHOLATY, W.F.; LEDFORD, E.B.; DALY, J.G. & BILLINGS, T.A. Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of Crotalidae, Elapidae and Viperidae. *Toxicon, 9*:131-8, 1971.
8. REED, L.J. & MÜENCH, H. A simple method of stimating fifty per cent and points. *Amer. j. Hyg., 27*:493-7, 1938.
9. ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, S.M.P.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL_{50} do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) em *Mus musculus* Linnaeus, 1758. *Mem. Inst. Butantan, 37*:131-37, 1973.
10. ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bücherl, W. & Buckley, E., ed. *Venomous animals and their venoms.* New York, Academic Press, 1971.
11. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. *In*: Veronesi, R., ed. *Doenças infecciosas e parasitárias.* 6.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.
12. SCHENBERG, S. Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan, 29*:213-26, 1959.
13. SILES-VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos.* São Paulo, 1977. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/.
14. SILES-VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM-ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-23, 1978/79.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H. M. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:271-279, 1980/81.

---

15. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *42/43*:325-36, 1978/79.

16. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & BANCHER, W. Padronização do emprego de camundongos na determinação da atividade tóxica de venenos ofídicos. II. Venenos dos gêneros *Crotalus* e *Micrurus*. Resumo — VIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Viña del Mar — Chile, outubro, 1979.

17. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & JARDIM, E.G. Perspectivas de padronização das titulações de venenos e antivenenos elapídicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*: — , 1980/81.

18. VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. med. brasil.*, *26*(6): 212-18, 1980.

Mem. Inst. Butantan
44/45:281-288, 1980/81

POSSIBILIDADE DA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DO VENENO DE *LACHESIS MUTA MUTA* E DA TITULAÇÃO DO ANTIVENENO ESPECÍFICO, EM CAMUNDONGOS

Medardo SILES VILLARROEL *
Flávio ZELANTE **
Raymundo ROLIM ROSA ***
José Luís DE LORENZO ****

RESUMO: Os autores testaram, em camundongos, a eficiência das vias intraperitoneal e intravenosa, tanto para a determinação da atividade tóxica, em termos de DL_{50}, do veneno de *Lachesis muta muta*, como para o doseamento do antiveneno específico.

Lotes de seis animais foram inoculados, pela via intraperitoneal, com doses crescentes de veneno, e observados após 10, 30, 60 minutos, 24 e 48 horas; todas as mortes ocorreram no período compreendido entre 60 minutos e 24 horas, sendo sempre proporcionais à progressão das doses. A inoculação intravenosa, por outro lado, não proporcionou os mesmos resultados; os animais, sem exceção, morreram durante os primeiros 30 minutos após a inoculação.

A via intraperitoneal permitiu, também, o doseamento do antiveneno específico, possibilitando a sua titulação em termos de mg ou de número de DL_{50} de veneno neutralizado por ml.

Os resultados demonstram a validade da via intraperitoneal de camundongos como modelo experimental satisfatório para essas finalidades.

PALAVRAS-CHAVE: Veneno de *Lachesis muta muta*, titulações do veneno e do antiveneno laquético, em camundongos.

INTRODUÇÃO

Devido ao elevado número de acidentes, é grande o interesse despertado pelo estudo dos venenos e antivenenos ofídicos, sendo bastante

* Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

** Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

*** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan. Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**** Professor-Assistente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 4365 — São Paulo — Brasil.

extensa a literatura pertinente. Todavia, poucos foram os autores que se preocuparam com a análise, "in vivo", da ação dos venenos das espécies de *Lachesis*. Este aparente desinteresse possivelmente esteja relacionado com a limitada distribuição geográfica dessas serpentes encontradas apenas na América Central e na América do Sul [9]. No Brasil, são encontradas somente na Região Amazônica e nas florestas da Vertente Atlântica Centro-Leste [8, 9], sendo pequeno o número de acidentes relatados [13].

Brazil e Rangel Pestana [3] (1909), testaram vários animais com as finalidades de determinar a toxicidade dessas peçonhas e de dosar os respectivos antivenenos; concluíram que as aves são mais sensíveis à ação dos venenos ofídicos e adotaram, como modelo experimental, o pombo e a via intravenosa. Foram os primeiros pesquisadores a divulgar informes relativos à atividade tóxica do veneno laquético e da ação neutralizante do antiveneno. Mais tarde, Rosenfeld [13] (1976) descreveu a sintomatologia e a evolução clínica da intoxicação laquética, observando indivíduos que sofreram acidentes por serpentes desse gênero.

Bolaños [1] (1972), estudando a toxicidade de peçonhas de serpentes da Costa Rica, comparou a variação da atividade do veneno de *Lachesis muta stenophrys*, quando inoculado pelas vias intravenosa e intraperitoneal de camundongos. Verificou que a primeira via determinava maior toxicidade.

Apesar da inconveniência do uso de pombos para a determinação da toxicidade de venenos, até o presente, em nosso país, ainda é adotado o método proposto por Vital Brazil [2] (1907). Sendo a Farmacopéia Brasileira [6] (1977) omissa a respeito do laquético, seu doseamento é realizado a partir de inoculações intravenosas em pombo, que são observados durante 24-48 horas, embora Siles Villarroel [15] (1977) e Siles Villarroel e cols. [16, 17, 18, 19] tenham demonstrado que o camundongo e as vias intraperitoneal ou intravenosa, conforme o caso, constituem o modelo mais adequado para ensaios com venenos e antivenenos botrópicos, elapídicos e crotálicos.

Devido à inexistência de informações e dando continuidade às observações anteriormente realizadas, neste trabalho os autores se propuseram a analisar, comparativamente ao pombo, o comportamento do camundongo como animal experimental e as vias intravenosa e intraperitoneal, como vias de inoculação para a determinação da toxicidade do veneno da espécie *Lachesis muta muta* e da atividade neutralizante do antiveneno específico.

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno laquético

O veneno utilizado em todos os ensaios, foi obtido por extração manual de várias serpentes adultas *Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766, dessecado a vácuo e, após a cristalização, mantido em geladeira, a ± 4°C. Quando do uso, foi preparada uma solução concentrada a 1% em solução de NACl a 0,85%. A partir desta, foram preparadas todas as demais diluições utilizadas.

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.· ROLIM-ROSA, R. & DE LORENZO, J. L. Possibilidade da determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:281-288, 1980/81.

Para as posteriores comparações, a Dose Mínima Mortal (DMM) do veneno, determinada em pombos segundo o método de Vital Brazil, correspondeu a 225,0 μg do veneno seco. Em todas as determinações realizadas, as mortes ocorreram em até 30 minutos.

Antiveneno laquético

O antiveneno específico foi obtido através da hiperimunização de cavalos e purificado de acordo com o método de Pope modificado [7] (1961). Quando da realização dos ensaios, foi diluído a 1:2 em virtude da sensibilidade apresentada pelos camundongos ao fenol, normalmente adicionado como preservador dos imunessoros purificados.

A sua atividade neutralizante, determinada em pombos (método de Vital Brazil), foi equivalente a 1,5 mg/ml.

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos brancos (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758), sem distinção de sexo, adultos jovens, pesando 20 g ± 2,0 g, procedentes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP; estes animais receberam inoculações pelas vias intravenosa ou intraperitoneal, no volume de 0,5 e 1,0 ml, respectivamente. Foram utilizados lotes de seis animais por dose; após as inoculações, foram observados por um período máximo de 48 horas, com leituras parciais aos 10, 30 e 60 minutos e 24 horas.

Determinação da DL_{50} do veneno

Foi realizada de acordo com o método de Reed & Müench [12] (1938).

RESULTADOS

Para possibilitar a determinação da DL_{50}, foi necessária a avaliação prévia das zonas de toxicidade do veneno, inoculado tanto pela via intravenosa como pela intraperitoneal. Os resultados constam das tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1

Determinação da zona de toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas			
	25	50	100	200
10 minutos	0/6	0/6	2/6	6/6
30 minutos	0/6	0/6	3/6	—
60 minutos	0/6	0/6	3/6	—
24 horas	0/6	0/6	3/6	—
48 horas	0/6	0/6	3/6	—

TABELA 2

Determinação da zona de toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas			
	50	100	200	400
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6
24 horas	0/6	0/6	0/6	6/6
48 horas	0/6	0/6	0/6	—

A partir dessas informações, foram realizados os ensaios determinantes da DL_{50}, cujos resultados constam das tabelas 3 e 4.

TABELA 3

Tentativa de determinação da DL_{50} do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas					
	50,00	60,00	72,00	86,40	103,68	124,42
10 minutos	1/6	1/6	1/6	1/6	6/6	6/6
30 minutos	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—
60 minutos	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—
24 horas	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—
48 horas	1/6	1/6	1/6	1/6	—	—

TABELA 4

Determinação da DL_{50} do veneno de *Lachesis muta muta* inoculado, pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	250,00	280,00	313,60	351,23	393,38	440,58	DL_{50}
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	3/6	4/6	5/6	6/6	6/6	295,27 μg
48 horas	0/6	3/6	4/6	5/6	—	—	295,27 μg

A tabela 5 apresenta os resultados dos ensaios para a determinação do título neutralizante do imunessoro específico, através da via intraperitoneal.

TABELA 5

Doseamento do antiveneno de *Lachesis muta muta* (0,5 ml), aferido frente ao veneno específico (DL_{50}= 295,27 μg); mistura inoculada, pela via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos.

Veneno de *L. muta muta*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
1,0	0,10	0,40	37°C	0/6	0/6
1,1	0,11	0,39		0/6	0/6 *
1,2	0,12	0,38	x	1/6	1/6
1,3	0,13	0,37		2/6	3/6
1,4	0,14	0,36	30 min.	3/6	4/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *L. muta muta* neutraliza completamente 4,4 mg ou 14,9 DL_{50} do veneno respectivo.

DISCUSSÃO

Ao contrário do método de Vital Brazil, o emprego de camundongos que sofreram inoculações pela via intraperitoneal possibilitou a determinação da DL_{50} do veneno de *Lachesis muta muta*, com satisfatória reprodutibilidade.

Embora, em todos os ensaios realizados, o período de observação tenha sido mantido até 48 horas, quando da inoculação intravenosa, as mortes ocorreram, sistematicamente, dentro dos primeiros 30 minutos, com as doses próximas ou superiores à zona de toxicidade (Tabela 3), não permitindo a determinação da DL_{50}. Com isto, ficou evidenciado que a inoculação intravenosa não é adequada para essa finalidade.

Ao contrário, quando o veneno foi administrado pela via intraperitoneal, as mortes se sucederam somente após 60 minutos (Tabela 4), obedecendo a uma regularidade e guardando uma relação com a progressão das doses inoculadas. A DL_{50} equivalente a 295,27 µg do veneno, correspondente à leitura de 24 horas, manteve-se para a de 48 horas, permanecendo esta característica constante em todos os ensaios realizados. Desta forma, torna-se desnecessária a leitura até 48 horas, reduzindo o período de observação.

As demais vias usuais de inoculação não foram verificadas no presente trabalho, devido às observações de outros autores, que demonstraram serem elas menos eficientes [2, 3].

Embora Bolaños [1] (1972) tenha utilizado a via intravenosa para a determinação da DL_{50} da peçonha de *Lachesis muta stenophrys*, os nos-

sos resultados não podem ser cotejados devido à provável constituição diversa do veneno analisado por aquele autor, apesar de serem produtos de serpentes do mesmo gênero.

As mortes precoces, observadas quando da inoculação intravenosa, possivelmente sejam devidas à somatória de diferentes atividades do veneno, dentre as quais a coagulação intravascular constatada por Rosenfeld [13] em humanos, embora estes testes "in vitro" tenham demonstrado que este veneno é dotado de fraca atividade coagulante [14]. Todavia, Deutsch & Diniz [4] (1955), Diniz e cols. [5] (1973) e Oliveira [10] (1974), empregando o método de Ware & Seegers [20] (1949), observaram o contrário.

A DL_{50} determinada nas presentes observações (295,27 µg), superior à DMM verificada em pombos (225,0 µg), demonstra que estes animais, embora de maior porte mas morrendo dentro dos primeiros 30 minutos após a inoculação, são dotados de elevada sensibilidade ao veneno em si ou a algum dos fatores que o constituem. A DMM, nestas condições, não determina a real toxicidade do veneno, mas um fenômeno particular da via de inoculação, pois o mesmo foi observado nos camundongos que sofreram inoculação pela mesma via, num determinado limiar da progressão das doses (Tabela 3).

O mesmo modelo experimental permitiu o doseamento da potência do antiveneno laquético específico, possibilitando expressá-la em termos de mg de veneno ou em número de DL_{50} neutralizadas por ml. Esta conduta, confirmando as recomendações de Bolaños [1, 11], comportou-se de forma semelhante à verificada com o antiveneno botrópico [15, 17].

Assim, a atividade tóxica responsável pelas manifestações clínicas dos venenos de *Lachesis muta muta* e das principais espécies botrópicas do Brasil e, ainda, a capacidade neutralizante dos antivenenos específicos, somente podem ser determinadas de forma segura, econômica e reprodutível, empregando-se a via intraperitoneal de camundongos.

CONCLUSÕES

1. A inoculação intraperitoneal em camundongos possibilitou, satisfatoriamente, a determinação da DL_{50} do veneno de *Lachesis muta muta* e o doseamento do antiveneno específico;

2. ao contrário, conforme a dose, a inoculação intravenosa promoveu a morte rápida dos animais, no máximo em 30 minutos, tornando inviáveis tais determinações.

ABSTRACT: The authors tested in mice the efficiency of intraperitoneal and intravenous routes for the determination of the toxic activity, in terms of LD_{50}, of *Lachesis muta muta* venom as well as for the dosage of specific antivenins.

Groups of 6 animals were inoculated via intraperitoneal with increasing doses of venom, and observed after 10, 30, and 60 min, 24 and 48 h; death ocurred between 60 min and 24 h, always proportional to the progression of the doses. The intravenous

inoculation, on the other hand, did not produce the same results; without exception, the animals died within the first 30 min after inoculation.

Moreover, the intraperitoneal route allowed the dosage of the specific antivenin, granting its titration in terms of mg or the number of LD_{50} of neutralized venom per ml.

The results demonstrated the intraperitoneal route in miec as a satisfactory cxperimental model for this purposc.

KEY-WORDS: *Laehesis muta muta* vcnom; titrations in mice of lachesis vcnom, and its antivenins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLAÑOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the withe mouse. *Amer. j. trop. Med. Hyg., 21*:360-3, 1972.

2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo, 10*:457-62, 1907.

3. BRAZIL, V. & RANGEL PESTANA, B. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Rev. méd. São Paulo, 12*:415-25, 1909.

4. DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. Some proteolytie activities of snake vcnoms. *J. biol. Chem., 216*:17-26, 1955.

5. DINIZ, C.R.; MAGALHÃES, A. & OLIVEIRA, G.J. Proteases de serpentes brasileiras. I. Separação de enzima coagulante (Clotase) do veneno de *Lachesis mutus. Ciên. e Cult., 25*:872, 1973.

6. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ª ed., São Paulo, Organização Andrei Editora S.A., 1977.

7. FURLANETTO, R.S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoseélieo.* São Paulo, 1961. p-64-5. /Tese — Faculdade de Farmáeia e Odontologia da Universidade de São Paulo/.

8. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 36*:109-208, 1972.

9. HOGE, A.R. & ROMANO HOGE, S.A.R.W.L. Poisonous snakes of the world. Part. I — Check list of the Pit Vipers Viperoidea, Viperidae, Crotalinae. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:179-310, 1978/79.

10. OLIVEIRA, G.J. *Purifieação e propriedades de uma enzima do veneno de* Lachesis muta muta *eom atividade de trombina.* Belo Horizonte, 1974. /Tese — Instituto de Ciências Biológieas da Universidade Federal de Minas Gerais/.

11. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de Procedimientos — Producción y pruebas de eontrol en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínieo, antivenenos y de la gangrena gaseosa. Enero, 1977.

12. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of stimating fifty per cent and points. *Amer. j. Hyg., 27*:493-7, 1938.

13. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: Veronesi, R., ed., *Doenças infeeiosas e parasitárias.* 6.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.

14. ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G. & KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms. Determination of coagulant and fibrinolytic index of diferent species. *Mem. Inst. Butantan, 29*:143-63, 1959.

15. SILES-VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópieos.* São Paulo, 1977. /Tese — Instituto de Ciências Biomédieas da Universidade de São Paulo/.

SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM-ROSA, R. & DE LORENZO, J. L. Possibilidade da determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:281-288, 1980/81.

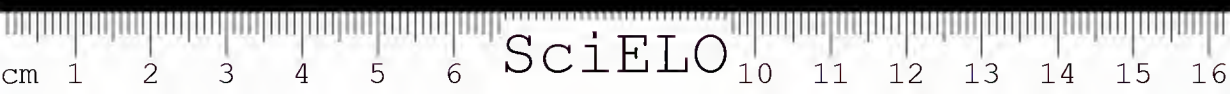
---

16. SILES-VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM-ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-23, 1978/79.

17. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:325-36, 1978/79.

18. SILES-VILLARROEL, M. ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & GOMES JARDIM, E. Perspectivas de padronização das titulações de venenos e antivenenos elapídicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*: — , 1980/81.

19. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H.M. Verificações das atividades tóxicas de venenos crotálicos e neutralizante dos antivenenos específicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*: — , 1980/81.

20. WARE, A.G. & SEEGERS, W.H. Two stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. *Am. j. Clin. Path., 19*:471-82, 1949.

Mem. Inst. Butantan
44/45:289-297, 1980/81

PERSPECTIVAS DE PADRONIZAÇÃO DAS TITULAÇÕES DE VENENOS E ANTIVENENOS ELAPÍDICOS, EM CAMUNDONGOS

Medardo SILES-VILLARROEL *
Raymundo ROLIM-ROSA **
Flávio ZELANTE ***
Elizabete Gomes JARDIM VIEIRA ****

RESUMO: Os autores, utilizando venenos das espécies *Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus*, demonstram que a atividade tóxica desses venenos pode ser determinada, satisfatoriamente, através de inoculações intravenosa e intraperitoneal em camundongos. Também demonstram que a potência de neutralização dos imunessoros antielapídicos obtidos em cavalos, pode ser determinada, utilizando-se as mesmas vias de inoculação, em camundongos. Descrevem, também, a ocorrência de neutralização cruzada entre os venenos e antivenenos estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Titulações de venenos e antivenenos elapídicos; neutralização cruzada entre venenos e antivenenos do gênero *Micrurus*.

INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores [17, 19, 20], foi demonstrado que a inoculação intraperitoneal, permite o emprego de camundongos na avaliação da atividade tóxica de venenos e no doseamento de antivenenos botrópicos.

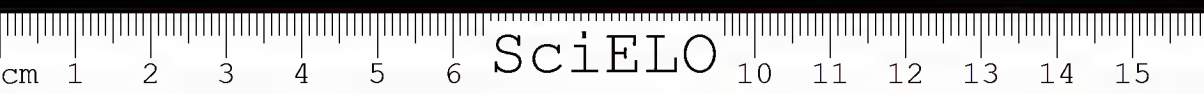
Quanto à titulação de venenos e antivenenos elapídicos — gênero *Micrurus* — a Farmacopéia Brasileira [10] (1977) é omissa. Assim, até o presente, essas titulações são realizadas segundo o método original de Brazil [6] (1907), à semelhança do recomendado para os venenos e anti-

* Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

*** Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**** Assistente do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 4365 — São Paulo — Brasil.

venenos crotálicos [10], devido a ambos os venenos apresentarem atividade neurotóxica [16, 22].

Todavia, outros pesquisadores como Cohen e cols. [7, 8, 9], Bolaños [1, 2, 3], Bolaños e cols. [4, 5] e Vital Brazil e cols. [21] (1976-77) já haviam verificado algumas das atividades biológicas desses venenos e de seus respectivos antivenenos, inoculados pelas vias intravenosa e intraperitoneal, em camundongos.

O Manual de Procedimentos OMS/OPS [13] (1977) apresenta, no capítulo atinente à produção de antivenenos, os métodos utilizados para avaliação da toxicidade das peçonhas e potência dos antivenenos que, em suas linhas gerais, são semelhantes aos propostos por Siles Villarroel e cols. [18] (1976) e Siles Villarroel [17] (1977).

Ainda de acordo com recomendações contidas no Boletim da Organização Mundial da Saúde [14] (1981), verifica-se que as mesmas vêm de encontro aos nossos propósitos de tentativa de padronização de antiveneno elapídico, assim como de todos os soros antipeçonhentos produzidos no Brasil.

No presente trabalho, adotando a mesma metodologia anteriormente utilizada [17], os autores se propõem a avaliar a toxicidade do veneno e a potência de antivenenos do gênero *Micrurus* e, paralelamente, verificar a possível neutralização cruzada entre os venenos e antivenenos estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

Venenos elapídicos

Foram utilizados venenos das espécies *Micrurus frontalis* (Duméril, Bibron et Duméril, 1854) *Micrurus corallinus* (Merrem, 1820) [12], procedentes de várias regiões do Brasil e obtidos de diversas serpentes adultas, por extração manual, submetidos a secagem a vácuo e, após a cristalização, mantidos em geladeira em torno de 4°C.

As soluções de veneno foram preparadas, inicialmente, na concentração de 1%, em solução de cloreto de sódio a 0,85%. A partir destas soluções concentradas, foram preparadas as diluições de acordo com as necessidades dos experimentos.

Antivenenos elapídicos

Os antivenenos específicos monovalentes, obtidos mediante hiperimunização de cavalos, foram concentrados e purificados segundo o método de Pope modificado [11] (1961). Em todos os ensaios, os imunessoros utilizados foram diluídos a 1:2, devido à sensibilidade dos camundongos ao agente preservativo (fenol), normalmente adicionado aos antivenenos purificados [17].

Animais utilizados

Foram utilizados camundongos brancos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), de ambos os sexos, adultos jovens pesando entre 18 e 22 g, procedentes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Univer-

sidade de São Paulo, inoculados pela via intravenosa ou intraperitoneal, no volume de 0,5 e 1,0 ml, respectivamente, para cada dose. Em todos os ensaios, foram sempre utilizados lotes de seis animais por dose. Após a inoculação, os camundongos foram observados por um período máximo de 48 horas, com observações parciais de 30 e 60 minutos, 24 e 48 horas.

Cálculo da DL50

A atividade tóxica dos venenos foi determinada através do método de Reed e Müench [15] (1938).

RESULTADOS

A partir das soluções de veneno a 1%, foram avaliadas as zonas de toxicidade, necessárias para a determinação das respectivas DL50. As tabelas de 1 a 4, apresentam resultados dos ensaios com os venenos de *M. frontalis* e *M. corallinus*, inoculados pelas vias intravenosa e intraperitoneal em camundongos; as tabelas de 5 a 8, apresentam os resultados de avaliação de potência dos antivenenos específicos monovalentes, inoculados pelas mesmas vias e para a mesma espécie animal. Finalmente, as tabelas 9 e 10, contêm os resultados das reações de neutralização cruzada entre os dois venenos e antivenenos estudados.

TABELA 1

Determinação da DL50 do veneno de *Micrurus frontalis* inoculado, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	20,00	23,00	26,45	30,42	34,98	40,23	DL50
30 minutos	0/6 *	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	1/6	3/6	4/6	5/6	6/6	6/6	24,05 μg
48 horas	1/6	3/6	4/6	5/6	—	—	24,05 μg

TABELA 2

Determinação da DL50 do veneno de *Micrurus frontalis* inoculado, pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	25,00	30,00	36,00	43,20	51,84	62,21	DL50
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	2/6	3/6	5/6	6/6	6/6	35,06 μg
48 horas	0/6	2/6	3/6	5/6	—	—	35,06 μg

* Em todas as tabelas, o denominador representa o número de animais inoculados e, o numerador, o número de animais mortos.

SILES VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & VIEIRA, E. G. J. Perspectivas de padronização das titulações de venenos e antivenenos elapídicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:289-297, 1980/81.

TABELA 3

Determinação da DL50 do veneno de *Micrurus corallinus* inoculado, pela via intravenosa (0,50 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Tempos de observação	Doses em microgramas						
	6,96	8,00	9,20	10,56	12,17	13,99	DL50
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	0/6	3/6	4/6	6/6	6/6	9,62 μg
48 horas	0/6	2/6	4/6	6/6	—	—	8,60 μg

TABELA 4

Determinação da DL50 do veneno de *Micrurus corallinus* inoculado, pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Tempos de observação	Doses em microgramas								
	8,00	9,60	11,52	13,82	16,58	19,90	24,88	29,86	DL50
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
24 horas	0/6	1/6	1/6	2/6	3/6	5/6	5/6	6/6	16,16 μg
48 horas	0/6	1/6	1/6	2/6	3/6	5/6	5/6	—	16,16 μg

TABELA 5

Doseamento do antiveneno de *Micrurus frontalis* (0,25 ml), colocado frente ao veneno específico (DL50 = 24,05 μg); mistura inoculada, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de *M. frontalis*		Sol. Salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,2	0,02	0,23	37°C	0/6	0/6
0,3	0,03	0,22		0/6	0/6
0,4	0,04	0,21	x	0/6	0/6
0,5	0,05	0,20	30 min.	0/6	0/6 *
0,6	0,06	0,19		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *M. frontalis* neutraliza 4,0 mg ou 166,32 DL50 do veneno específico.

TABELA 6

Doseamento do antiveneno de *Micrurus frontalis* (0,5 ml), colocado frente ao veneno específico (DL50 = 35,06 μg); mistura inoculada, pela via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de *M. frontalis*		Sol. Salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,8	0,08	0,42		0/6	0/6
0,9	0,09	0,41	37ºC	0/6	0/6
1,0	0,10	0,40	x	0/6	0/6 *
1,1	0,11	0,39	30 min.	3/6	4/6
1,2	0,12	0,38		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *M. frontalis* neutraliza 4,0 mg ou 114,09 DL50 do veneno específico.

TABELA 7

Doseamento do antiveneno de *Micrurus corallinus* (0,25 ml), colocado frente ao veneno específico (DL50 = 8,6 μg); mistura inoculada, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de *M. corallinus*		Sol. Salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,1	0,01	0,24		0/6	0/6
0,2	0,02	0,23	37ºC	0/6	0/6
0,3	0,03	0,22	x	0/6	0/6 *
0,4	0,04	0,21	30 min.	2/6	2/6
0,5	0,05	0,20		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *M. corallinus* neutraliza 2,4 mg ou 279,07 DL50 do veneno específico.

TABELA 8

Doseamento do antiveneno de *Micrurus corallinus* (0,5 ml), colocado frente ao veneno específico (DL50 = 16,16 μg); mistura inoculada, pela via intraperitoneal (1,0 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de *M. corallinus*		Sol. Salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,5	0,05	0,45		0/6	0/6
0,6	0,06	0,44	37ºC	0/6	0/6
0,7	0,07	0,43	x	0/6	0/6 *
0,8	0,08	0,42	30 min.	2/6	2/6
0,9	0,09	0,41		3/6	3/6

* Título: 1 ml de antiveneno de *M. corallinus* neutraliza 2,8 mg ou 173,27 DL50 do veneno específico.

TABELA 9

Doseamento do antiveneno de *Micrurus frontalis* (0,25 ml), colocado frente ao veneno de *Micrurus corallinus* (DL50 = 8,6 μg); mistura inoculada, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de *M. corallinus*		Sol. Salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
			37°C		
0,05	0,005	0,245	x	0/6	0/6
0,1	0,01	0,24	30 min.	0/6	0/6 *
0,2	0,02	0,23		3/6	3/6
0,3	0,03	0,22		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *M. frontalis* neutraliza 0,8 mg ou 93,02 DL50 do veneno de *M. corallinus*.

TABELA 10

Doseamento do antiveneno de *Micrurus corallinus* (0,25 ml), colocado frente ao veneno de *Micrurus frontalis* (DL50 = 24,05 μg); mistura inoculada, pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos de 18 a 22 g.

Veneno de *M. frontalis*		Sol. Salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
			37°C		
0,05	0,005	0,245	x	0/6	0/6
0,1	0,01	0,24	30 min.	0/6	0/6 *
0,2	0,02	0,23		6/6	—
0,3	0,03	0,22		6/6	—

* Título: 1 ml de antiveneno de *M. corallinus* neutraliza 0,8 mg ou 33,26 DL50 do veneno de *M. frontalis*.

DISCUSSÃO

A exemplo do demonstrado em observações anteriormente realizadas, camundongos inoculados quer pela via intravenosa quer pela via intraperitoneal, prestaram-se também, satisfatoriamente, para a titulação de venenos e antivenenos elapídicos. Mais uma vez ficou confirmada a dispensabilidade do pombo para tais titulações.

Devido à natureza neurotóxica [16, 22] dos venenos empregados, que não induziram a mortes imediatas — durante os primeiros 60 minutos — tanto a via intravenosa como a intraperitoneal podem ser utilizadas para as titulações dos venenos e dos antivenenos. Todavia, a primeira delas revelou maior suscetibilidade do animal, o que, em termos de quantidade de veneno a ser empregada, torna-a mais adequada.

Vital Brazil e cols.[21] (1976/77), verificaram a existência de diferentes graus de atividade tóxica de venenos de *M. frontalis*, conforme a região de onde provém a serpente. Assim, as peçonhas de animais procedentes do Estado de Mato Grosso foram menos ativas do que as correspondentes do Estado de S. Paulo, quando inoculadas pela via intravenosa em camundongos.

Bolaños[1] (1972) e Bolaños e cols.[4] (1975), estudando diversos venenos elapídicos, tanto da Costa Rica como da Colômbia e dos Estados Unidos, inoculados pelas vias intravenosa e intraperitoneal em camundongos, verificaram que eram dotados de graus variados de toxicidade que variavam, também, conforme a via de inoculação.

Cohen e cols.[9] (1971), trabalhando com amostras de venenos de diversas regiões do Continente Americano obtiveram antivenenos em coelhos. Os autores verificaram, através da soroneutralização cruzada, que o antiveneno de *M. frontalis* tinha a capacidade de neutralizar, com variados graus de eficiência, todos os demais venenos por eles estudados. Os demais antivenenos, embora dotados de alguma capacidade neutralizante, estão sempre inferiores ao antiveneno de *M. frontalis*. Nossos resultados demonstraram que o antiveneno de *M. corallinus*, é dotado de maior capacidade de soroneutralização cruzada do que o antiveneno de *M. frontalis*.

Este fato deve constituir um alerta, pois destaca a necessidade de que os imunessoros elapídicos sejam dotados de uma atividade neutralizante a mais ampla possível, tendo-se em vista as naturais dificuldades do não especialista, em reconhecer a espécie causadora do acidente.

CONCLUSÕES

1. A atividade tóxica dos venenos de *Micrurus frontalis* e de *Micrurus corallinus*, pode ser determinada satisfatoriamente em camundongos, através de inoculações pelas vias intravenosa e intraperitoneal;
2. também a capacidade neutralizante dos antivenenos de *M. frontalis* e de *M. corallinus* pode ser determinada em camundongos empregando-se a mesma metodologia;
3. embora ocorrendo soroneutralização cruzada, o antiveneno de *M. frontalis* neutralizou apenas 0,8 mg do veneno de *M. corallinus*, enquanto que na reação específica neutralizava 4,0 mg; por sua vez, o antiveneno de *M. corallinus* neutralizou 0,8 mg do veneno de *M. frontalis*, enquanto que na reação específica neutralizou 2,4 mg.

ABSTRACT: The authors, using venoms of the species *Micrurus frontalis* and *Micrurus corallinus*, demonstrated that the toxic activity of these venoms can satisfactorily be determined by intravenous and intraperitoneal inoculation in mice. They also ascertained that the neutralization potency of the elapidic antivenins, made in horses, can be determined in mice using the same route of inoculation.

They also describe the occurrence of cross-neutralization between the venoms and antivenins under study.

KEYWORDS: Elapid venom and antivenin titration; cross-neutralization between venoms of the genus *Micrurus* and their antivenins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLAÑOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Am. j. Trop. Med. Hyg.*, *21*:360-3, 1972.

2. BOLAÑOS, R. Venoms of coral snakes *(Micrurus spp.)* report on a multivalent antivenim for the Americas. *Bull. Pan. Am. Health Organiz.*, *12*:23-7, 1978.

3. BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. & TAYLOR, R.T. Estudios immunológicos de los venenos de las principales *Micrurus* de Norte América, Centro América, Panamá y Colombia. *Abstracts 3rd Latinoamerican Congr. Parasitol. Antioquia Médica*, *23*:518, 1973.

4. BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. & TAYLOR, R.T. The production and characteristics of a coral snako *(Micrurus mipartitus hertwigi)* antivenim. *Toxicon.*, *13*:139-42, 1975.

5. BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. & ABALOS, J.W. Venenos de las serpientes coral *(Micrurus spp):* Informe sobre um antiveneno polivalente para las Américas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, *84*(2):128-33, 1978.

6. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo*, *10*:457-62, 1907.

7. COHEN, P. & SELIGMANN, E.B. JR. Immunologic studies of coral snake venom. *Mem. Inst. Butantan*, *33*:339-47, 1966.

8. COHEN, P.; DAWSON, J.H. & SELIGMANN, E.B. JR. Cross-Neutralization of *Micrurus fulvius fulvius* (Coral snake) venom by anti-*Micrurus carinicauda dumerilli* serum. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, *17*:308-10, 1968.

9. COHEN, P.; BERKELEY, W.H. & SELIGMANN, E.B. JR. Coral snake venoms. In vitro relation of neutralizing and precipitating antibodies. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, *20*:646-9, 1971.

10. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ª ed. São Paulo, Organização Andrei Editora, SA., 1977.

11. FURLANETTO, R.S. *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961. p.-64-5. /Tese — Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo/.

12. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan*, *36*:109-208, 1972.

13. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de procedimientos — Producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, antivenenos y de la gangrena gaseosa. Enero, 1977.

14. ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Caractérisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux: Progrès realisés, 1981.

15. REED, L.J. & MÜENCH, H. A simple method of stimating fifty per cent and points. *Amer. J. Hyg.*, *27*:493-7, 1938.

16. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: Veronesi, R., ed. *Doenças infecciosas e parasitárias.* 6.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.

17. SILES-VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos.* São Paulo, 1977. /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/.

---

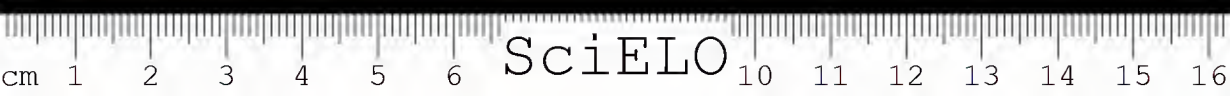
18. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; FURLANETTO, R.S. & ZELANTE, F. Determinação da DL50 de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* em camundongos inoculados por via intraperitoneal. Resumo — VIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Porto Alegre, julho, 1976.

19. SILES-VILLARROEL, M.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F. & FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:325-36, 1978/79.

20. SILES-VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM-ROSA, R.; & FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 42/43*:311-23, 1978/79.

21. VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M.D. & PELLEGRINI FILHO, A. Physiopathologie et thérapeutique de l'envenomation expérimentale causée par le venin de *Micrurus frontalis*. *Mem. Inst. Butantan, 40/41*:221-40, 1976/77.

22. VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. *Rev. med. Brasil., 26*(6): 212-8, 1980.

Mem. Inst. Butantan
44/45:299-306, 1980/81

EMPREGO DE CAMUNDONGOS NA TITULAÇÃO DE VENENOS E ANTIVENENO ESCORPIÔNICOS

Elisabete Gomes Jardim VIEIRA *
Medardo SILES VILLARROEL **
Flávio ZELANTE ***
Sheila da Costa ÁVILA *
Raymundo ROLIM ROSA****

RESUMO: Foi determinada, em termos de DL50, a toxicidade dos venenos de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* em camundongos, através das vias intraperitoneal e intravenosa. Com a mesma metodologia, foi avaliada a capacidade neutralizante do antiveneno de *T. serrulatus* em relação ao veneno específico e paraespecífico. Os resultados sugerem recomendar a metodologia ora proposta, como método prático, econômico e reprodutível para titulação dos venenos e antiveneno escorpiônicos estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Titulação de venenos do gênero *Tityus;* doseamento de antiveneno escorpiônico; soroneutralização cruzada entre venenos escorpiônicos.

INTRODUÇÃO

O escorpionismo no Brasil está afeto, principalmente, às espécies *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, responsáveis por acidentes que, mesmo desprovidos da dramaticidade característica devida aos envenenamentos ofídicos, podem representar sério risco ao acidentado, particularmente para crianças [13].

Embora os escorpiões apresentem ampla distribuição mundial, ainda é pequeno o conhecimento sobre a natureza imunobiológica de seus venenos, principalmente sobre a sua atividade tóxica. O mesmo ocorre

* Assistentes do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan.
** Professor Livre Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
*** Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
**** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
Endereço para correspondência: Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

em relação ao preparo e doseamento dos antivenenos respectivos. As informações são bastantes desencontradas, devido à ausência de padrões quanto à técnica de obtenção do veneno, à espécie do animal de prova e à via de inoculação [1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 14, 23, 24, 25].

Já Maurano [9] (1915) e Brazil [3] (1918), estudaram a ação tóxica do veneno e a atividade neutralizante do antiveneno de *T. bahiensis*, através de inoculações subcutâneas em cobaias. Sergent [15] (1938) determinou a Dose Mínima Mortal (DMM) de triturado de glândulas de *Prionurus australis*, em camundongos, pela via subcutânea. Magalhães [8] (1947) comparou a atividade antitóxica do antiveneno escorpiônico produzido pelo Instituto Ezequiel Dias frente a venenos de espécies existentes em diversos outros países. Bücherl [4] (1953) utilizou camundongos e as vias subcutânea e intravenosa para analisar a atividade tóxica dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, obtidos em diferentes fases de extração, verificando qual delas ("gotículas límpidas, hialinas, opalescentes e as últimas gotas leitosas espessas") evidenciava maior toxicidade.

A exemplo do demonstrado por Siles Villarroel e cols. [17, 18, 19] (1978/79) e Siles Villarroel e cols. [20, 21, 22] (1980/81) com os venenos ofídicos e, devido à ausência na Farmacopéia Brasileira [7] de recomendações técnicas para as titulações dos venenos e antivenenos escorpiônicos, os autores se propuseram a determinar, através das inoculações intraperitoneal e intravenosa em camundongos, a toxicidade dos venenos escorpiônicos obtidos por extração elétrica e avaliar, comparativamente, a capacidade neutralizante do antiveneno de *T. serrulatus* em relação ao veneno específico e paraespecífico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Venenos escorpiônicos — Foram utilizados venenos cristalizados, fornecidos pela Seção de Artrópodes Peçonhentos do Instituto Butantan, obtidos por extração elétrica, das espécies *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922 e *Tityus bahiensis* Perty, 1834.

As soluções dos venenos foram preparadas a 1% em solução salina (NaCl 0,85%). Para efeito de comparação, foram determinadas as DMM, segundo Brazil [3] (1918), tendo os venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* apresentados títulos de 400 µg e 200 µg, respectivamente.

2. Antiveneno escorpiônico — Foi utilizado o antiveneno purificado de *T. serrulatus*, proveniente da Seção de Soros Antipeçonhentos do Instituto Butantan, produzido em cavalos e com título neutralizante de 2 DMM por ml, equivalente a 0,8 mg de veneno específico neutralizado por ml, segundo o método de Brazil [3] (1918). Quando do seu emprego, o antiveneno foi diluído a 1/2, com a finalidade de evitar o possível efeito do fenol, normalmente adicionado aos imunessoros purificados.

3. Animais utilizados — Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758) adultos jovens, de 20 g ± 2 g, procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São

Paulo, sem distinção de sexo, inoculados pelas vias intraperitoneal e intravenosa. Em todos os ensaios, foram utilizados lotes de seis camundongos por dose de veneno.

4. Determinação da toxicidade dos venenos escorpiônicos — Em todos os ensaios, os animais receberam doses escalonadas dos venenos, num volume de 0,5 ml para cada dose e observados aos 10, 30 e 60 minutos, 24 e 48 horas após as inoculações, sendo a toxicidade determinada, em termos de DL50, pelo método de Reed & Müench [12] (1938).

5. Doseamento do antiveneno de *T. serrulatus* — Em todos os ensaios, foram utilizadas quantidades constantes de antiveneno e doses variáveis de veneno, obtendo-se um volume final equivalente a 0,5 ml por camundongo. A mistura, veneno-antiveneno, foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Os animais inoculados foram observados por um período máximo de 48 horas. Os títulos do antiveneno foram expressos em miligramas ou em número de DL50 de veneno neutralizado por ml de antiveneno.

RESULTADOS

As tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentam os resultados das atividades tóxicas dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*.

TABELA 1

Determinação da DL50 do veneno de *T. serrulatus* inoculado pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						DL50
	20,00	26,00	33,80	43,94	57,12	74,25	
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	2/6	4/6	4/6	
24 horas	0/6	2/6	4/6	5/6	5/6	6/6	31,85 μg
48 horas	0/6	2/6	4/6	5/6	6/6	—	30,88 μg

TABELA 2

Determinação da DL50 do veneno de *T. serrulatus* inoculado pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						DL50
	14,20	16,90	20,11	23,93	28,48	33,89	
10 minutos	0/6	0/6	0/6	1/6	2/6	4/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	2/6	2/6	5/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	3/6	4/6	5/6	
24 horas	0/6	1/6	2/6	4/6	5/6	6/6	22,02 μg
48 horas	0/6	1/6	3/6	5/6	6/6	—	20,11 μg

TABELA 3

Determinação da DL50 do veneno de *T. bahiensis* inoculado pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						DL50
	15,40	20,00	26,00	33,80	43,94	57,12	
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
60 minutos	0/6	0/6	1/6	2/6	2/6	5/6	
24 horas	0/6	1/6	3/6	5/6	6/6	6/6	26,00 μg
48 horas	0/6	1/6	3/6	5/6	—	—	26,00 μg

TABELA 4

Determinação da DL50 do veneno de *T. bahiensis* inoculado pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Tempos de observação	Doses em microgramas						DL50
	7,10	9,23	12,00	15,60	20,28	26,36	
10 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	3/6	
30 minutos	0/6	0/6	0/6	0/6	3/6	5/6	
60 minutos	0/6	0/6	0/6	1/6	3/6	6/6	
24 horas	0/6	0/6	1/6	2/6	4/6	—	17,35 μg
48 horas	0/6	0/6	1/6	2/6	4/6	—	17,35 μg

As tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam os resultados das provas de soroneutralização específica e paraespecífica, realizadas com o antiveneno de *T. serrulatus* frente aos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis*.

TABELA 5

Doseamento do antiveneno de *T. serrulatus* (0,25 ml), em relação ao veneno específico (DL50 = 30,88 μg); mistura inoculada pela via intraperitoneal (0,5 ml), em camundongos.

Veneno de *T. serrulatus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,10	0,010	0,240	37ºC	0/6	0/6
0,15	0,015	0,235		0/6	0/6 *
0,20	0,020	0,230	x	2/6	2/6
0,25	0,025	0,225	30 min.	3/6	3/6
0,30	0,030	0,220		6/6	—

* Título: 1 ml do antiveneno de *T. serrulatus* neutraliza 1,2 mg ou 38,86 DL50 do veneno específico.

TABELA 6

Doseamento do antiveneno de *T. serrulatus* (0,25 ml), em relação ao veneno específico (DL50 = 20,11 μg); mistura inoculada pela via intravenosa (0,5 ml), em camundongos.

Veneno de *T. serrulatus*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,10	0,010	0,240	37°C	0/6	0/6
0,15	0,015	0,235		0/6	0/6 *
0,20	0,020	0,230	x	4/6	4/6
0,25	0,025	0,225	30 min.	6/6	—
0,30	0,030	0,220		6/6	—

* Título: 1 ml do antiveneno de *T. serrulatus* neutraliza 1,2 mg ou 57,91 DL50 do veneno específico.

TABELA 7

Doseamento do antiveneno de *T. serrulatus* (0,25 ml), em relação ao veneno de *T. bahiensis* (DL50 = 26,00 μg); mistura inoculada pela via intraperitoneal (0,5 ml) em camundongos.

Veneno de *T. bahiensis*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,05	0,005	0,245	37°C	0/6	0/6
0,10	0,010	0,240		0/6	0/6 *
0,15	0,015	0,235	x	1/6	1/6
0,20	0,020	0,230	30 min.	6/6	—
0,25	0,025	0,225		6/6	—

* Título: 1 ml do antiveneno de *T. serrulatus* neutraliza 0,8 mg ou 30,77 DL50 do veneno de *T. bahiensis*.

TABELA 8

Doseamento do antiveneno de *T. serrulatus* (0,25 ml), em relação ao veneno de *T. bahiensis* (DL50 = 17,35 μg); mistura inoculada pela via intravenosa (0,5 ml) em camundongos.

Veneno de *T. bahiensis*		Sol. salina ml	Incubação	Tempos de observação	
mg	ml			24 h	48 h
0,05	0,005	0,245	37°C	0/6	0/6
0,10	0,010	0,240		0/6	0/6 *
0,15	0,015	0,235	x	2/6	2/6
0,20	0,020	0,230	30 min.	6/6	—
0,25	0,025	0,225		6/6	—

* Título: 1 ml do antiveneno de *T. serrulatus* neutraliza 0,8 mg ou 46,11 DL50 do veneno de *T. bahiensis*.

DISCUSSÃO

Siles Villarroel e cols. [17, 18, 19] (1978/79) e Siles Villarroel e cols. [20, 21, 22] (1980/81), trabalhando com venenos e antivenenos ofídicos, propuseram a utilização do camundongo como animal de prova e as vias intraperitoneal ou intravenosa, como vias de inoculação, como substitutos do pombo (método de Vital Brazil) para os ensaios biológicos daqueles produtos. De forma semelhante, as observações agora realizadas demonstraram a possibilidade do emprego do camundongo, para a titulação dos venenos e doseamento do antiveneno escorpiônico.

Tendo-se em vista que a Farmacopéia Brasileira não estabelece normas e padrões para os ensaios biológicos destes produtos, os atuais resultados se constituem numa proposta para a adoção de critérios padronizados para as titulações dos venenos e antivenenos escorpiônicos. O emprego do camundongo confere condições mais econômicas e de melhor reprodutibilidade, o que representa fator importante para a confiabilidade da eficácia terapêutica do antiveneno em questão.

A análise da atividade dos dois venenos estudados em camundongos, demonstra que o da espécie *T. bahiensis* é dotado de maior toxicidade do que o de *T. serrulatus*, fato constatado através da sua inoculação tanto pela via intraperitoneal (DL50 26,00 µg e 30,88 µg, respectivamente) como pela via intravenosa (DL50 17,35 µg e 20,11 µg, respectivamente). Estes resultados não concordam com observações realizadas no homem, por Rosenfeld [13] (1976).

Por outro lado, a via intravenosa demonstrou maior sensibilidade dos animais inoculados do que a intraperitoneal, aos dois tipos de venenos.

As mortes imediatas (durante os primeiros 10 minutos após a inoculação do veneno) ocorreram quando os animais foram inoculados pela via intravenosa com doses superiores a uma DL50. Este fenômeno, comum para os dois tipos de venenos (Tabelas 2 e 4), não foi observado quando as peçonhas foram inoculadas pela via intraperitoneal (Tabelas 1 e 3).

Os nossos resultados não podem ser cotejados com outros, pois, os informes apresentados pelos autores que anteriormente trabalharam com veneno escorpiônico, basearam-se em metodologia diferente da adotada no presente trabalho.

A soroneutralização específica, entre veneno e antiveneno de *T. serrulatus*, demonstrou que o antiveneno foi capaz de neutralizar 1,2 mg do veneno específico, fato este demonstrado por ambas as vias de inoculação (Tabelas 5 e 6). Quanto a soroneutralização paraespecífica, o antiveneno de *T. serrulatus* neutralizou 0,8 mg do veneno de *T. bahiensis* constatada também pelas duas vias de inoculação (Tabelas 7 e 8). Embora a reação específica evidenciasse maior capacidade neutralizante, foi demonstrada, também, a possibilidade de neutralização paraespecífica, o que caracteriza a existência de algumas frações ou determinantes imunogênicos comuns entre os dois venenos estudados. Todavia, esta reação não apresenta a mesma eficiência neutralizante, visto que, houve

uma redução em torno de 33% de atividade (1,2 mg e 0,8 mg, respectivamente). Assim, o antiveneno de *T. serrulatus* poderia ser utilizado na terapêutica dos dois tipos de envenenamentos, indistintamente, o que constitui um recurso auxiliar de real importância para a terapêutica dos acidentes escorpiônicos mais freqüentes no Brasil.

Para efeito de uniformidade de conduta nos estudos e perspectivas de padronização dos ensaios biológicos com venenos e antivenenos ofídicos, aranêicos e escorpiônicos, julgamos recomendável a adoção do camundongo, como animal de prova e a via intraperitoneal como via de eleição.

CONCLUSÕES

1. Camundongos se prestaram adequadamente, quando receberam inoculações pela via intraperitoneal, para a titulação da atividade tóxica dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis;*
2. o doseamento do antiveneno de *T. serrulatus* pode ser realizado, indistintamente, pelas vias intraperitoneal ou intravenosa, em camundongos;
3. o veneno de *T. bahiensis* evidenciou maior toxicidade do que o de *T. serrulatus*, quando inoculados pelas duas vias, em camundongos;
4. o antiveneno de *T. serrulatus* neutralizou 1,2 mg/ml do veneno específico e 0,8 mg/ml do veneno de *T. bahiensis*.

ABSTRACT: The toxicity, in terms of LD50, of the venoms of *Tityus serrulatus* and *T. bahiensis* was determined in mice by intraperitoneal and intravenous route. With the same methodology, the neutralizing capacity of the antivenin for *T. serrulatus* was evaluated with relation to specific and paraspecific venoms.

The results permit the recommendation of the methodology here proposed, as a practical, inexpensive and reproducible method for the titration of the studied scorpion venoms and antivenins.
KEYWORDS: Titration of venoms of the genus *Tityus;* dosage of scorpionic antivenin; serum cross-neutralization between scorpion venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAM, K.R. & WEISS, Ch. Some aspects of the pharmacology of the venoms of african scorpions. *Mem. Inst. Butantan, 33*(2):603-14, 1966.
2. BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do envenenamento pela picada de escorpião e seu tratamento. Mem. apres. ao *VI.º Congr. Brasileiro Med. e Cir.*, S. Paulo, 1907.
3. BRAZIL, V. Soro antiescorpiônico. *Mem. Inst. Butantan, 1*:47-52, 1918.
4. BÜCHERL, W. Escorpiões e escorpionismo no Brasil. II. Atividade das peçonhas de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* sobre camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 25*(1):83-108, 1953.
5. CORRADO, A.P.; ANTONIO, A. & DINIZ, C.R. Recent advances on the mechanism of action of Brazilian scorpion venom — *T. serrulatus. Mem. Inst. Butantan, 33*(3):957-60, 1966.

6. DINIZ, C.R.; GOMEZ, M.V.; ANTONIO, A. & CORRADO, A.P. Chemical properties and biological activity of *Tityus* venom. *Mem. Inst. Butantan*, *33*(2):453-6, 1966.
7. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ª ed. São Paulo, Organização Andrei Editora S.A., 1977.
8. MAGALHÃES, O. Soro antiescorpiônico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, *45*(4): 847-51, 1947.
9. MAURANO, H.R. *Do escorpionismo.* Rio de Janeiro, 1915. Tese.
10. OROPEZA, R.M.; PÉREZ, G.G. & MANES, S.C. Un nuevo método para la obtención de suero antialacrán. *Rev. Inv. Salud Pública* (México), *32*: 163-71, 1972.
11. POZO, E.C. Del Pharmacology of the venoms of Mexican *Centruroides*. *Mem. Inst. Butantan*, *33*(2):615-26, 1966.
12. REED, L.J. & MÜENCH, H. A simple method of stimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg.*, *27*:493-7, 1938.
13. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. In: Veronesi, R., ed. *Doenças infecciosas e parasitárias.* 6.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.
14. ROSIN, R. Effects on the venom of the scorpion *Nebo hierichonticus* on with mice, other scorpions and Paramecia. *Toxicon*, *7*:71-3, 1969.
15. SERGENT, E. Venin de scorpion et sérum antiscorpionique. *Arch. Inst. Pasteur D'Algérie*, *16*(3):257-78, 1938.
16. SILES VILLARROEL, M. *Contribuição ao estudo de venenos e antivenenos botrópicos.* São Paulo, 1977 /Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/.
17. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *42/43*:311-23, 1978/79.
18. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *42/43*:325-36, 1978/79.
19. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & GUIDOLIN, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan*, *42/43*: 337-44, 1978/79.
20. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & GOMES JARDIM, E. Perspectivas de padronização das titulações de venenos e antivenenos elapídicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*, 1980/81.
21. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F.; BANCHER, W. & PIOTO, H.M. Verificação da atividade tóxica de venenos crotálicos e da capacidade neutralizante dos antivenenos específicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*, 1980/81.
22. SILES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; ROLIM ROSA, R. & DE LORENZO, J.L. Possibilidades da determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*, 1980/81.
23. VILELA, E. Soroterapia antiescorpiônica. *Brasil méd.*, *31*(46), 1917.
24. WHITTEMORE, C.F.W.; KEEGAN, L.C.H.L. & BOROWITZ, J.L. Studies of scorpion antivenins. 1. Paraspecificity. *Bull Org. Mond. Santé*, *25*: 185-8, 1961.
25. ZLOTKIN, E.; MIRANDA, F.; KUPEYAN, C. & LISSETKY, S.A. New toxic protein in the venom of scorpion *Androctonus australis* Hector. *Toxicon*, *9*:9-13, 1971.

Mem. Inst. Butantan
44/45:307-315, 1980/81

EMPREGO SIMULTÂNEO DE ANTÍGENOS BOTULÍNICOS TIPOS A E B, EM UM MESMO ANIMAL, PARA OBTENÇÃO DE ANTITOXINA BIVALENTE *

Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA **
Hideyo IIZUKA **
Hisako Gondo HIGASHI **
Maria Antonieta da SILVA **
Raymundo ROLIM ROSA **

RESUMO: Descreve-se método para a obtenção da antitoxina botulínica bivalente tipo AB, através de hiperimunização simultânea de cavalos com antígenos adsorvidos pelo alúmen de potássio. Empregando-se novo esquema de imunização, e utilizando antígeno botulínico bivalente AB, obtiveram a respectiva antitoxina cujos títulos específicos médios variavam entre os níveis de 140 a 200 UI/ml para o tipo A e de 70 a 130 UI/ml para o tipo B, tendo como referência o soro padrão internacional. Após a purificação e concentração pelo método de Pope, os títulos finais atingiram valores da ordem de 750 a 1000 UI/ml.

Através deste novo método, foi verificado que é possível obter soro antibotulínico bivalente tipo AB, num mesmo animal, com resultados superiores aos processos anteriormente utilizados, com menores dispêndios de antígenos, de animais soroprodutores, de tempo e de trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: Botulismo; hiperimunização simultânea, de eqüinos, com antígenos tipos A e B; toxina e toxóide botulínicos tipos A e B.

INTRODUÇÃO

Em 1972, pela primeira vez no Brasil, foi preparado o soro antibotulínico tipo A, por um de nós, e, posteriormente, o tipo B, pela hiperimunização de eqüídeos, através do antígeno adsorvido pelo sulfato duplo de alumínio e potássio (11,18). Utilizando novo esquema de imunização, foi possível obter soros antitóxicos que apresentavam teor médio de antitoxina botulínica ao redor de 750 a 1000 UI/ml, quando purificados e concentrados, pelo método de Pope (20).

---

* Trabalho apresentado no VIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Viña del Mar, Chile.
** Serviço de Imunologia — Instituto Butantan.

OLIVEIRA, E. P. T.; IIZUKA, H.; HIGASHI, H. G.· SILVA, M. A. & ROLIM ROSA, R. Emprego simultâneo de antígenos botulínicos tipos A e B, em um mesmo animal, para obtenção de antitoxina bivalente. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:307-315, 1980/81.

Verificaram, também, que as antitoxinas dos tipos A e B não apresentam reação cruzada com a toxina heteróloga, comportando-se, portanto, como soros monoespecíficos (11).

Contudo, em virtude da especificidade da antitoxina (13, 14) e da eficácia de seu emprego depender de um diagnóstico prévio, estabelecido através de prova de toxinotipia e do resultado do exame bacteriológico, os quais sempre demandam precioso tempo, o tratamento deve ser imediatamente iniciado com a soroterapia bivalente AB, tendo em vista que os casos de botulismo humano ocorreram com maior freqüência com esses dois tipos (1, 4, 5, 6, 7, 12, 16, 27), com alto índice de mortalidade (7, 15, 16, 19).

Portanto, propusemo-nos verificar a possibilidade de obtenção da antitoxina botulínica bivalente tipo AB, num mesmo animal soroprodutor.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido utilizando, em linhas gerais, a mesma metodologia desenvolvida e descrita pelos autores em trabalhos anteriores (11, 18). Todavia, julgamos interessante destacar as seguintes considerações.

1. *Cepas utilizadas* — as cepas de *Clostridium botulinum* tipo A, n.º 306-IB e tipo B, n.º 204-IB, ambas dotadas de alto poder toxigênico, foram escolhidas do estoque da germoteca do Instituto Butantan, para a obtenção das respectivas toxinas.

2. *Obtenção de toxinas* — as toxinas botulínicas dos tipos A e B, foram obtidas no meio de cultura proposta por Wadsworth, modificado (11, 18, 23, 28). A toxicidade das culturas filtradas foram tituladas segundo Nigg e col. (17), em camundongos de 18 a 22 g de peso, através da inoculação pela via intraperitoneal de alíquotas de 0,5 ml de séries de diluições de toxina em solução tampão de gelatina fosfatada (11).

3. *Antígenos* — para a preparação dos antígenos dos tipos A e B, foram utilizadas toxinas filtradas que apresentavam cerca de 8 x 10^5 a 1 x 10^6 DMM por mililitro, em camundongos, para cada tipo (Tabela 1). A anatoxina botulínica, resultante da destoxificação da toxina pelo for-

TABELA 1

Toxicidade da cultura de *Clostridium botulinum* tipos A e B e condições de desenvolvimento da toxina *

Tipo	Cepa	Incubação Temperatura (°C)	Tempo (dias)	DMM
A	306-IB	37	6	1 x 10^6
B	204-IB	37	9	8 x 10^5

* Inoculação de 0,5 ml por via intraperitoneal, em camundongos de 18 a 22 g.

maldeido, na taxa final de 0,5%, era precipitada pelo alúmen na concentração final de 1,25% do adsorvente. Após a prova de inocuidade (11, 28), era submetida à prova de imunogenicidade em cobaios de 250 a 300 g de peso, de acordo com os estudos de Rice e col. (25). Os resultados desta prova permitiam revelar os toxóides que apresentavam melhor poder imunogênico, os quais passavam a ser utilizados como antígeno para hiperimunização de cavalos. O antígeno bivalente era constituído de mistura homogênea em proporções equivalentes das frações A e B.

4. *Animais soroprodutores* — para a obtenção do soro antibotulínico bivalente, foram selecionados 9 cavalos sadios, jamais empregados na produção de anti-soros, de cerca de 8 a 10 anos de idade, em condições físicas consideradas satisfatórias pelo exame prévio, clínico veterinário, e separados em dois lotes:

Lote 1 — 4 animais, os quais eram inoculados com antígeno monoespecífico. Assim, os cavalos n.º 232 e 233 foram destinados à produção do soro antibotulínico do tipo A, enquanto que os de n.º 243 e 244 o foram para o tipo B, observando-se, em ambos os casos, o esquema de imunização já citado (11, 18).

Lote 2 — 5 cavalos, os quais receberam os n.ºs 234, 240, 248, 249 e 250, todos inoculados com o antígeno bivalente AB. Neste lote, também os soros antitóxicos eram obtidos pela hiperimunização de eqüinos, em duas fases, segundo o esquema de hiperimunização estabelecido em trabalhos anteriores (11, 18), sendo que a primeira fase correspondia à imunização de base. Devemos destacar que, em virtude de fórmula antigênica estar encerrada no mesmo volume proposto no esquema citado, cada animal soroprodutor recebia exatamente 50% de cada fração antigênica, em relação aos animais do lote 1.

Na fase de hiperimunização, ao invés de administrar a quantidade total de cada dose imunizante num único ponto, o volume de antígeno misto AB correspondente era subdividido em cinco frações iguais, cada qual sendo inoculada subcutaneamente em cinco pontos diferentes, na região do dorso do animal.

Na última semana, cada cavalo pertencente a cada lote, era submetido à sangria exploradora. As reimunizações eram repetidas após cada período de repouso de 45 dias (2) que sucedia imediatamente terminada a sangria final.

O sangue recebido de cada animal era recolhido em solução anticoagulante de citrato de sódio, sendo o plasma separado e a seguir tratado com preservativo antes de ser levado à câmara fria, a 4ºC, onde era mantido até o momento de purificação e concentração. As misturas de plasmas eram tratadas pelo método preconizado por Pope (20, 21), e modificado posteriormente (9).

5. *Soro e toxina padrões utilizados* — os soros antibotulínicos, padrões internacionais, eram provenientes de Statens Serum Institute de Copenhagen, Organização Mundial de Saúde, de onde vêm acondicionados em ampolas sob forma liofilizada e cujas atividades específicas estão contidas em 0,1360 mg para o tipo A, e 0,1740 mg para o tipo B (4).

As toxinas botulínicas padrões utilizadas no experimento foram preparadas no laboratório do Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan e padronizadas "in vivo", ao nível de 0,1 L+ (Limite morte), para o tipo A e de 1 L+, para o tipo B, respectivamente, pelos soros padrões antibotulínicos monoespecíficos, e conservadas sob forma de solução glicerinada (4).

O método de titulação dos soros era realizado pelo teste de neutralização "in vivo", em consonância com o preconizado pela Organization Mondiale de la Santè.

6. *Animais utilizados* — camundongos brancos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), sem distinção de sexo, de 18 a 22 g, e cobaias de 250 a 300 g de peso, fornecidos pelo Biotério Geral do Instituto Butantan.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudando os surtos de botulismo no mundo inteiro, verifica-se que a grande maioria dos casos humanos é provocada pela ingestão de alimentos contaminados pelas exotoxinas neuroparalíticas dos tipos A e B, e, com menor freqüência, pelo tipo E (1, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 26, 27).

A análise dos dados publicados na literatura nos permite concluir que os grandes surtos desta toxiinfecção apresentam características cíclicas e ocorrem, de maneira estreitamente correlacionada com as épocas de recessão econômica, sendo, portanto, a expansão do botulismo, atribuível ao aumento de preparações de conservas caseiras (12).

Neste aspecto, entre outros, Legroux e col. (15) constataram na França, durante a época de ocupação de 1940 a 1944, cerca de 500 focos de botulismo, envolvendo mais de 1000 intoxicados. Mais recentemente, Horwitz e col. (12) em 1974, nos E.U.A., registraram 20 surtos, num único ano, sendo o maior verificado desde 1935.

No Brasil, felizmente, o botulismo ainda é uma doença rara, uma vez que se acha registrado apenas um surto ocorrido em 1958 (19). Entretanto, neste acidente, 9 pessoas se intoxicaram das quais 7 tiveram êxito letal.

Do que foi exposto, dada a inexistência do soro antibotulínico bivalente tipo AB no país, e considerando que não existe outra terapêutica comprovadamente melhor para o botulismo, resolvemos estabelecer, pelo presente trabalho, uma metodologia para a obtenção de antitoxina botulínica bivalente, tipo AB.

O primeiro soro antibotulínico foi preparado por Van Ermengen pela imunização de equinos, utilizando toxina como antígeno. Em vista deste método apresentar certos inconvenientes (22), optamos pelo emprego de produto atóxico, ou seja, o toxóide botulínico absorvido pelo alúmen, que apresenta inúmeras vantagens; entre outras a faculdade que o toxóide oferece de poder ser manipulado com absoluta segurança, conservando todas as propriedades imunogênicas que favorecem a biossíntese de imunoglobulinas específicas.

Adaptando o esquema de imunização idealizado e posto em prática pelo laboratório do Setor de Anaeróbios do Instituto Butantan (11,18), podemos observar o resultado apresentado pelos cavalos pertencentes ao Lote 1, que serviram como controle, com toxóides botulínicos monovalentes dos tipos A e B (Tabela 2). Pela mesma, os resultados revelam níveis médios de 166 UI/ml de antitoxina botulínica tipo A, e de 116 a 125 UI/ml de tipo B.

A Tabela 3 mostra níveis de antitoxina botulínica bivalente tipo AB, observados em cavalos pertencentes ao Lote 2, que receberam antígeno misto tipo AB, onde se nota que os títulos médios da fração A variam de 140 a 200 UI/ml, enquanto que na fração B, oscilam de 70 a 130 UI/ml, no soro circulante. Pela análise destes dados, pode-se notar que existe tendência marcante da superior resposta imunogênica da fração A. Parece-nos que este fenômeno é atribuível ao efeito adjuvante do antígeno tipo B sobre o do tipo A, que se evidenciou na forma combinada, pois foi verificado que durante todo período de imunização, o tipo A respondeu em níveis entre 100 a 200 UI/ml, nas sangrias de prova, ao passo que o tipo B oscilou entre os valores de 50 até o máximo de 150 UI/ml (Tabela 3).

Apesar de Rice (24) ter observado que o poder imunogênico da fração B aumenta consideravelmente, quando se emprega o antígeno bivalente AB na imunização de camundongos, em nossos experimentos verificamos que ocorre fenômeno inverso. Esta divergência de resultados correlaciona-se, possivelmente, com as diferentes espécies animais utilizadas.

Por outro lado, confrontando os resultados obtidos nas Tabelas 2 e 3, pode-se destacar um fato muito interessante: embora os cavalos pertencentes ao Lote 2 tivessem recebido apenas 50% da quantidade de cada fração antigênica em relação aos do Lote 1, a síntese de antitoxina botulínica alcançou praticamente os mesmos níveis séricos deste. Assim, na fração A foram encontrados títulos médios oscilando entre os valores de 140 a 200 UI/ml, contra a média de 166 UI/ml da imunização monovalente. O tipo B também comportou-se de maneira análoga, alcançando média de 70 a 130 UI/ml, contra 116 a 125 UI/ml, da imunização monoespecífica.

TABELA 2

Níveis de antitoxina botulínica tipos A e B, observados em quatro cavalos do Lote 1, no decurso de seis hiperimunizações

Cavalos n.º	Tipo	Títulos em UI/ml						Média aritmética UI/ml
		Hiperimunização						
		1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª	
232	A	100	200	200	100	200	200	166
233	A	100	200	200	100	200	200	166
243	B	50	100	150	100	150	150	116
244	B	50	150	150	100	150	150	125

OLIVEIRA, E. P. T.; IIZUKA, H.; HIGASHI, H. G.· SILVA, M. A. & ROLIM ROSA, R. Emprego simultâneo de antígenos botulínicos tipos A e B, em um mesmo animal, para obtenção de antitoxina bivalente. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:307-315, 1980/81.

TABELA 3

Níveis de antitoxina botulínica bivalente tipo AB, observados em cinco cavalos do Lote 2, no decurso de cinco hiperimunizações, através do antígeno misto

Cavalos n.º	Tipo	Títulos em UI/ml					Média aritmética UI/ml
		Hiperimunização					
		1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	
234	A	200	200	200	200	200	200
	B	—	150	150	150	50	100
240	A	200	200	200	200	200	200
	B	—	150	150	100	50	90
248	A	—	200	200	200	200	160
	B	150	150	150	150	50	130
249	A	100	200	100	100	200	140
	B	50	50	150	150	150	110
250	A	200	200	100	200	200	180
	B	—	150	150	—	50	70

A Tabela 4 mostra o resultado do doseamento do soro antibotulínico bivalente AB purificado, onde os níveis antitóxicos atingiram os valores de cerca de 1000 UI/ml para fração A e de 750 UI/ml, para o tipo B. Finalmente, este soro purificado e concentrado era diluído convenientemente para apresentar 500 UI/ml de antitoxina de cada tipo, para compor o soro antibotulínico bivalente AB, de acordo com as recomendações estabelecidas na XV Seção de "Expert Committee on Biological Standardization" da OMS.

TABELA 4

Dosagem do soro antibotulínico bivalente tipo AB purificado *

Soro antibotulínico		Tempo de observação em horas			
Fração	UI/ml	24	48	72	96
A	500	0/4	0/4	0/4	0/4
	750	0/4	0/4	0/4	0/4
	1000	0/4	0/4	0/4	0/4
	1250	0/4	0/4	2/4	4/4
B	500	0/4	0/4	0/4	0/4
	750	0/4	0/4	0/4	0/4
	1000	0/4	2/4	3/4	3/4
	1250	4/4	—	—	—

* Dose individual de 0,5 ml da mistura toxina-antitoxina, pela via intraperitoneal, em camundongos de 18 a 22 g, sendo a toxina ao nível de 0,1 L + para o tipo A, e L + para o tipo B, frente ao respectivo soro padrão internacional.

Também digno de registro foram as constatações de que o emprego de antígeno bivalente AB para a hiperimunização de eqüídeos oferece a conveniência de serem evitadas diluições recíprocas de soros monovalentes dos referidos tipos, visando a obtenção de soro anti-AB e, fato igualmente significativo, do processo não causar nos animais submetidos à produção da antitoxina bivalente, reações que o contraindiquem para a sua adoção definitiva (3).

CONCLUSÕES

1. Utilizando-se *Clostridium botulinum* tipo A, estirpe 306-IB e tipo B, 204-IB, foram obtidas as respectivas toxinas dosando cerca de 8 x 10^5 a 1 x 10^6 DMM para camundongos.

2. O antígeno bivalente AB, empregado na hiperimunização de cavalos, era constituído de mistura, em proporções equivalentes, de anatoxinas dos tipos A e B, precipitadas pelo alúmen.

3. As sangrias de prova apresentaram títulos médios de antitoxina botulínica bivalente variando entre os valores de 140 a 200 UI/ml para o tipo A e de 70 a 130 UI/ml, para o tipo B.

4. A mistura de plasma resultante de diversas imunizações, permitiu obter soro purificado e concentrado cujo título atingiu níveis da ordem de 750 a 1000 UI/ml de cada fração.

5. A hiperimunização simultânea de eqüinos soroprodutores, com o emprego de antígeno bivalente, apresenta a vantagem de evitar a diluição recíproca que resulta da mistura de soros monovalentes, bem como a de não causar, nos animais, reações indesejáveis em seu estado físico.

The usage of *Clostridium botulinum* Type AB antigen in the preparation of bivalente antitoxin.

ABSTRACT: The present paper describes the method employed in the preparation of bivalent *Clostridium botulinum* Type AB antitoxin by simultaneous hyperimmunization of horses with mixed alum potassium adsorbed antigen. By the use of a new immunization schema, and using a bivalent AB botulinic antigen, the AB antitoxin was obtained, whose mean specific titres varied between the 140-200 IU/ml serum levels for Type A, and 70-130 IU/ml, for Type B, respectively, when dosed against the international standard antitoxin. After purification and concentration by the method of Pope, their final titres reached values of 750 to 1000 IU/ml. Through this new method. it was verified that it is possible to obtain bivalent antibotulinic antitoxin Type AB in the same animal with results superior to those obtained by the processes formerly employed.

KEYWORDS: Botulism; bivalent hyperimmunization of horses; *Clostridium botulinum* Types A and B; food poisoning; *Clostridium botulinum* Types A and B toxin and toxoid.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKER JR., W.H.; WEISSMANN, J.B.; DOWELL JR., V.R.; GUTMANN, L. & KAUTTER, D.A. Type B botulism outbreak caused by a commercial food product. *J. Amer. med. Ass.*, *237*(5):456-9, 1977.

OLIVEIRA, E. P. T.; IIZUKA, H.; HIGASHI, H. G.· SILVA, M. A. & ROLIM ROSA, R. Emprego simultâneo de antígenos botulínicos tipos A e B, em um mesmo animal, para obtenção de antitoxina bivalente. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:307-315, 1980/81.

---

2. BARR, M. & GLENNY, A.T. Some practical applications of immunological principles. *J. Hyg.* (Lond.), *44*:135-42, 1945.

3. BITTNER, J.; OLARU, A.; POP, A.; POTORAC, E.; VOINESCO, V.; FICIU, S. & OPRISAN, R. Hyperimmunisation tétravalent des chevaux producteurs de sérum antigangréneux.
   1. Hyperimmunisation successive. *Arch. roum. Path. exp. Microbiol.*, *23*:253-60, 1964.

4. BOWMER, E.J. Preparation and assay of the International Standards for *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E antitoxins. *Bull. Org. mond. Santé*, *29*:701-9, 1963.

5. DOLMAN, C.E. Human botulism in Canada. *Canad. med. Ass. J.*, *110*(2): 191-7, 1974.

6. DOLMAN, C.E.; TOMECH, M.; CAMPBELL, C.C.R. & LAING, W.B. Fish eggs as a cause of human botulism: two outbreaks in Britsh Columbia due to types A and B botulism toxins. *J. infect. Dis.*, *106*:5, 1960.

7. DUMAS, J. *Bacteriologie médicale.* Paris, Flammarion, 1951. p. 692-706.

8. FUKUDA, T.; KITAO, T.; TANIKAWA, H. & SAKAGUCHI, G. An outbreak of type B botulism occurring in Miyazaki Prefecture. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, *23*:243-8, 1970.

9. FURLANETTO, R.S. Purificação e concentração de soro antiloxoscélico. In: *Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico.* São Paulo, 1961, p. 64-5 (Tese).

10. GONZÁLEZ, C. & GUTIÉRREZ, C. Intoxication botulinique humaine par *Clostridium botulinum* B. *Ann. Inst. Pasteur*, *123*:799-803, 1972.

11. HIGASHI, H.G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E.P.T. & SILVA, M.A. Preparação do soro antibotulínico tipo B, pela hiperimunização de cavalos, no Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan*, *42/43*:77-85, 1978/79.

12. HORWITZ, M.A.; MARR, J.S.; MERSON, M.H.; DOWELL, V.R. & ELLIS, J.M. A continuing common source outbreak of botulism in a family. *Lancet*, II (7936):861-3, 1975.

13. JOHNSON, H.M.; SMITH, B.; HALL, H.E. & LEWIS, K.H. Serological specificity of types A and B botulinal toxins and antitoxins. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, *126*:856-61, 1967.

14. LAMANNA, C. The most poisonous poison. *Science*, *130*(3378):763-72, 1959.

15. LEGROUX, R.; LEVADITI, J.C. & JÉRAMEC, C. Le botulisme en France pendant l'occupation (1940-1944). *Presse méd.* (Paris), *10*:139-40, 1947.

16. MEYER, K.F. The status of botulism as a world health problem. *Bull. Org. mond. Santé*, *15*:281-98, 1956.

17. NIGG, G.; HOTTLE, G.A.; COREILL, L.L.; ROSENWALD, A.S. & BEVERIDGE, G.W. Studies on botulism toxoids types A and B. I. Production of alum precipitated toxoids. *J. Immunol.* (Baltimore), *55*:245-54, 1947.

18. OLIVEIRA, E.P.T. Estudos sobre a preparação de soro antibotulínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan*, *36*:1-40, 1972.

19. PEREIRA FILHO, M.J. Diagnóstico biológico do surto de botulismo humano do Pronto Socorro de Porto Alegre. *Med. Cirurg.* (Porto Alegre), *19*(2): 52-111, 1958.

20. POPE, C.G. Disaggregation of protein by enzymes. *Brit. J. exp. Path.*, *19*: 245-51, 1938.

21. POPE, C.G. The action of proteolitic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Brit. J. exp. Path.*, *20*:201-12, 1939.

22. PRÉVOT, A.R. *Biologies des maladies dues aux anaérobes.* Paris, Flammarion, 1955. p.159-221.

---

23. REAMES, H.R.; KADULL, P.J.; HAUSEWRIGTH, R.D. & WILSON, J.B. Studies on botulinus toxoids types A and B. III. Immunization of man. *J. Immunol.* (Baltimore), *55*:309-24, 1957.

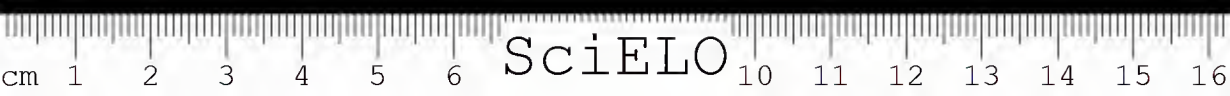
24. RICE, C.E. A preliminary study of the antigenic activity of mixtures of *Clostridium botulinum* toxoid types A and B. *Canad. J. Res. E.*, *25*:181-7, 1947.

25. RICE, C.E.; PALLISTER, E.F.; SMITH, L.C. & REED, G.B. *Clostridium botulinum* type A toxoids. *Canad. J. Res., E.*, *25*:167-74, 1947.

26. SÉBALD, M.; JOUGLARD, J. & GILLES, G. Botulisme humain de type B après ingestion de fromage. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur), *125*:349-57, 1974.

27. TRIVALENT botulinus antitoxins. Botulism — United States 1899-1967. Surveillance summary. *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, *17*:444-6, 1968.

28. WADSWORTH, A.B. *Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health.* 3rd. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947.

Mem. Inst. Butantan
44/45:317-323, 1980/81

AS BASES DE MANNICH DE HIDANTOINAS TERPÊNICAS II.*

Ema RABENHORST **
Raymond ZELNIK **

RESUMO: A síntese de Bases de Mannich N-substituídas das Hidantoinas dos terpenos citral, mentona, α-ionona e α-metil-ionona foi realizada por condensação com formaldeído e aminas secundárias em meio etanólico. Os rendimentos variam de 4,5 a 61%, verificando-se a substituição pelos radicais dialquilaminometilenos ao nível dos nitrogênios imídicos.

PALAVRAS-CHAVE: Hindantoinas, Terpenos, Bases de Mannich N-substituídas.

INTRODUÇÃO

Em pesquisa anterior [19] descrevemos as hidantoinas **1** e **2** dos terpenos carbonílicos citral, ionona e metil-ionona, a fim de avaliar o potencial farmacológico destes compostos. No decorrer deste estudo, verificamos a pouca hidrossolubilidade destas hidantoinas. Para torná-las hidrossolúveis, condição propícia para os testes farmacológicos, escolhemos a Reação de Mannich[2] por permitir a substituição do próton imídico pelo grupamento dialquilaminometileno, através da condensação com o formaldeído e uma amina secundária, formando uma base terciária que pode ser transformada em sal de amônio quaternário.

---

* Parte I, ref. 19.
Trabalho comunicado na 33.ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Salvador, BA, 15 de julho de 1981.

** Serviço de Química Orgânica do Instituto Butantan.

Outrossim, a literatura química descreve propriedades farmacológicas atribuídas a diversas Bases de Mannich [3, 5, 13] tais como benzimidazóis N-substituídos *4* (antivirais e antitumorais) [4], oxadiazoltionas *5* (pesticidas) [9], 2-mercapto-5-aril-1,3,4-oxadiazois *6* (antimicóticos) [6], bis-morfolina-metil-hidantoina *7* (citostático) [16].

1

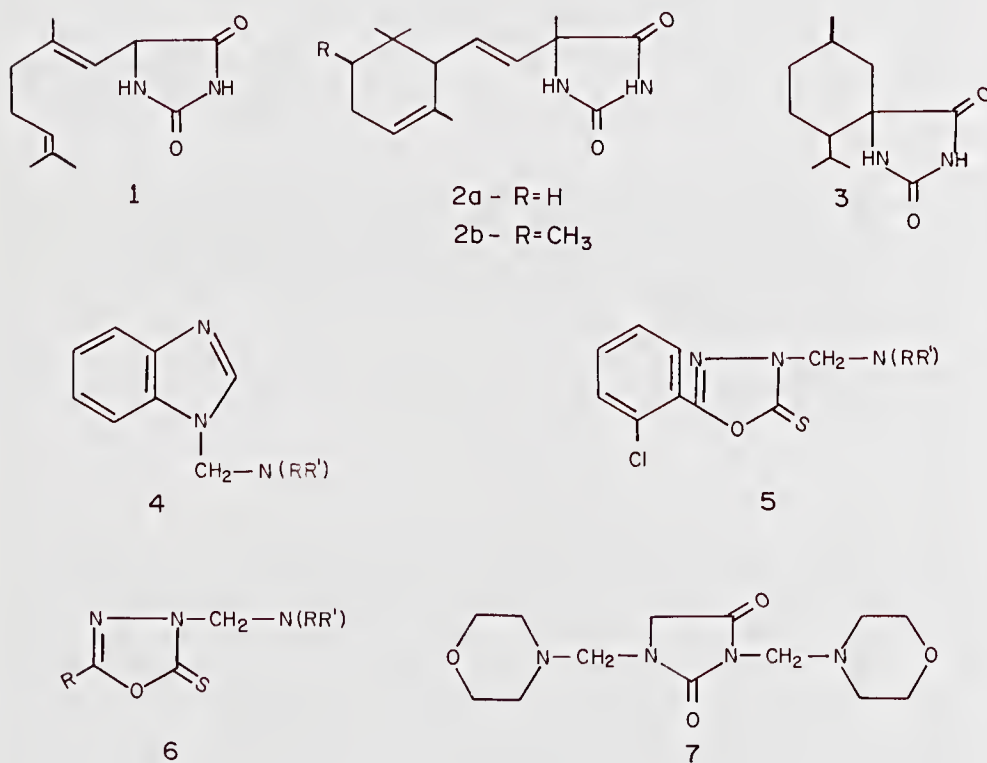
2a - R = H
2b - R = CH_3

3

4

5

6

7

A síntese das Bases de Mannich das hidantoinas do citral *1*, da α-ionona *2a*, da α-metil-ionona *2b* e da mentona *3* [11] foi efetuada em meio

etanólico pela reação da hidantoina com 2 equivalentes de amina e formol. Nos casos da morfolina e da difenilamina, verificamos uma monossubstituição no N-3 imídico que é tido como o mais reativo devido à influência das carbonilas adjacentes [15], obtendo-se os compostos *8* e *9*.

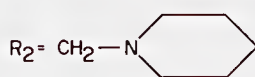
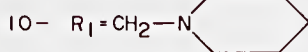
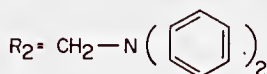
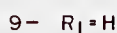
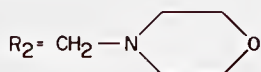
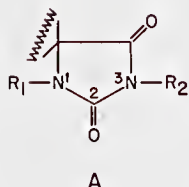
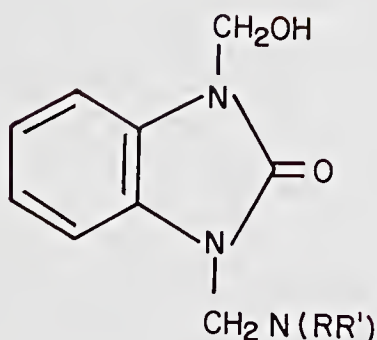
Com a piperidina e o formaldeído as hidantoinas reagiram, originando os derivados bi-substituídos aos quais atribuímos a estrutura *10*, fundamentada nas análises elementares.

No caso da piperazina, a condensação de um equivalente da amina com dois de hidantoina e de formol resultou na formação dos derivados N,N'-bis (3-hidantoinil-metileno) *11* semelhantes a outros exemplos citados na literatura [6, 10, 17, 18]. No infravermelho, a absorção a 3.300-3.200 cm^{-1} caracterizou a vibração de estiramento do N-H inalterado [1].

A comprovação das estruturas propostas para os produtos obtidos está sendo efetuada por análises espectroscópicas (IV, RMN de H^1 e EM), e os resultados serão publicados posteriormente.

R_1—N1, 2, 3N—R_2, O, O

A

	R_1	R_2
8−	R_1 = H	R_2 = CH_2—N O
9−	R_1 = H	R_2 = CH_2—N( )$_2$
10−	R_1 = CH_2—N	R_2 = CH_2—N
11 −	R_1 = H	R_2 = CH_2—N N—CH_2—A
12−	R_1 = H	R_2 = CH_2OH

A reação da hidantoina da mentona *3* com formol e difenilamina forneceu o composto N-hidróxi-metileno *12* sem conseguirmos a Base de Mannich desejada apesar de várias condições experimentais. Aliás, a obtenção de derivados N-hidróxi-metilenos no decorrer da Reação de Mannich foi salientada anteriormente[0, 7], e num exemplo citado para a benzimidazolona[20], há formação do composto *13*.

13

Na reação das hidantoinas do citral e da metil-ionona com formol e morfolina, não foram isolados derivados.

Os resultados deste estudo estão consignados na Tabela I.

PARTE EXPERIMENTAL

Os pontos de fusão foram registrados no aparelho Buchi 510 sem sofrer correções. Os espectros de massa foram determinados nos espectrômetros Hitachi RMU-7M e Hewlett-Packard HP 5980 A, de infravermelho no da Perkin-Elmer 727 B e os de ultravioleta no da Beckman DU-2 modelo 1098. Para a cromatografia em coluna empregamos gel de sílica (Merck 0,05-0,20 mm). Hexano-acetato de etila 1:1 e 1:2 foram os sistemas de solventes escolhidos para as análises de cromatografia em camada delgada e iodo o reagente para a detecção das manchas. A morfolina é da Koch-Light, a piperidina da Hopkin e Williams, a difenilamina da Merck, a piperazina da Tanabi: estes reagentes foram secos e destilados ou recristalizados. O formol é da Carlo Erba. Os terpenos carbonílicos citral, ionona, metil-ionona e mentol, matérias-primas para a obtenção das hidantoinas, são da Dierberger Óleos Essenciais: foram bidestilados a pressão reduzida. Através da espectrometria ultravioleta as iononas foram identificadas como sendo os isômeros α : α-ionona λ_{max}^{MeOH} 230 nm (ε 12884), lit.[12] λ_{max}^{EtOH} 230 nm (ε 15848); α-metil-ionona λ_{max}^{MeOH} 230 nm (ε 10950), lit.[8] λ_{max}^{EtOH} 237 nm (ε 8100). A mentona foi preparada por oxidação do mentol[14].

PROCEDIMENTO GERAL

Refluxa-se uma mistura de 0,01 mol da hidantoina terpênica, 0,02 mol da amina secundária e 0,022 mol de formol a 40% em 5 ml de

TABELA I

HIDANTOÍNA	AMINA SECUNDÁRIA	FÓRMULA	M+	P.F. °C	ANÁLISE ELEMENTAR Teór. C	H	N	Obt. C	H	N	RDTO. %
1	Piperidina	$C_{24}H_{40}N_4O_2$		115-118 b	69,19	9,68	13,45	68,98	10,15	13,18	4,5
	Piperazina	$C_{30}H_{46}N_6O_4$		193-197 f	64,95	8,36	15,15	65,49	8,46	15,63	76
2a	Morfolina	$C_{20}H_{31}N_3O_3$		133-138 b	66,45	8,65	11,62	66,41	8,52	11,50	31
	Difenilamina	$C_{28}H_{33}N_3O_2$	443	143-147 d	75,81	7,50	9,47	75,55	7,92	9,04	19
	Piperidina	$C_{27}H_{44}N_4O_2$	*	134-139 d	71,01	9,71	12,27	71,43	9,93	11,95	11
	Piperazina	$C_{36}H_{54}N_6O_4$	634	233-236 e	68,11	8,57	13,24	68,52	8,87	13,60	68
2b	Difenilamina	$C_{29}H_{35}N_3O_2$		123-128 d	76,11	7,71	9,18	76,44	8,05	9,16	8,5
	Piperidina	$C_{28}H_{46}N_4O_2$	*	124-128 a	71,45	9,85	11,90	71,45	9,62	11,41	24
	Piperazina	$C_{38}H_{58}N_6O_4$		219-223 e	68,85	8,82	12,68	68,72	8,95	12,42	50
3	Morfolina	$C_{17}H_{29}N_3O_3$	323	142-144 b	63,13	9,04	12,99	63,56	9,10	13,26	51
	Piperidina	$C_{24}H_{42}N_4O_2$	*	157-159 a	68,85	10,11	13,38	68,51	9,97	13,26	61
	Piperazina	$C_{30}H_{50}N_6O_4$	558	300-301 h g	64,48	9,02	15,04	64,76	8,67	15,36	95

Recristalizado em: a — hexano, b — acetona: hexano, c — clorofórmio, d — clorofórmio: hexano, e — clorofórmio: acetona, f — etanol, g — dimetilformamida: etanol, h — dimetilsulfóxido: água.

* Espectros em fase de interpretação.

etanol durante 3 a 5 horas. No caso da piperazina as proporções foram respectivamente de 0,02:0,011:0,03 mol. Após concentração o resíduo é submetido a cromatografia de coluna, exceto no caso do derivado N-metil-piperidínico da hidantoina da mentona 3-10 que cristalizou em hexano. Nos eluatos de hexano-acetato de etila 4:1 e 2:1 isola-se o produto que é purificado por recristalizações em solventes apropriados (Tabela I). Nas reações com piperazina ocorre precipitações após refluxo de 5 a 10 minutos, recolhendo-se o produto por filtração.

N-3-(hidroximetil)-espiro-mentil-hidantoina (3-12)

Uma mistura de 0,01 mol da hidantoina 3, 0,02 mol de difenilamina e 0,02 mol de formol a 40% em 5 ml de etanol foi refluxada durante 7 horas. Após concentração, o resíduo (313 mg) foi cromatografado. O produto (48 mg — 19%) foi isolado dos eluatos do hexano-acetato de etila 3:2, p.f. 168-172° (acetona-hexano), $M^{+}254$.

Calculado para $C_{13}H_{22}N_2O_3$: C 61,39, H 8,72, N 11,01%;

obtido: C 61,94, H 8,90, N 11,11%.

AGRADECIMENTOS

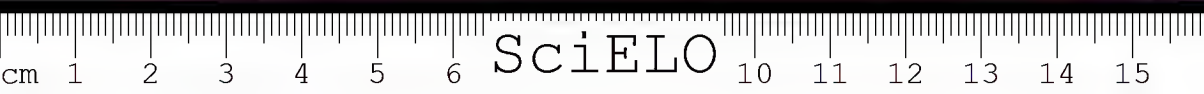
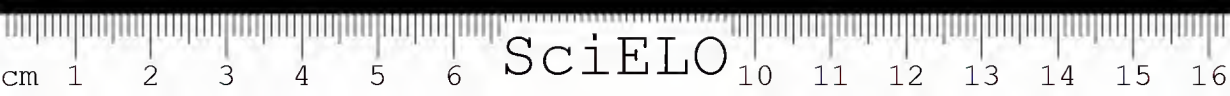
Agradecemos a Dra. Riva Moscovici, Instituto de Química da USP pelas análises elementares, ao Centro de Análises Instrumentais do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo pelos espectros de infravermelho e de massa, ao Dr. A. Haider, Institut de Chimie de l'Université de Lausanne pelos espectros de massa (HP 5980 A), a Química Maria Nazareth de C. Ferraz pela colaboração na fase final desta pesquisa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo auxílio financeiro concedido (N.º 2222-0900/77), aos Srs. Teodomiro Vieira Santos e Lourenço Blanc pela assistência técnica e a Dierberger Óleos Essenciais S.A., São Paulo, pelos terpenos carbonílicos oferecidos.

ABSTRACT: The synthesis of N-Mannich Bases of the hydantoins of the terpenes citral, menthone, α-ionone and α-methyl-ionone was accomplished by reaction with formaldehyde and the secundary amines morpholine, piperidine, diphenylamine and piperazine. The yields ranged from 4.5 to 61%.

UNITERMS: Hydantoins, Terpenes, N-Mannich Bases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELLAMY, L.J. *The Infra-red Spectra of Complex Molecules.* New York, John Wiley & Sons, 1959.
2. BLICKE, F.F. *Organic Reactions.* New York, John Wiley & Sons, 1947. vol. I, p. 303; REICHERT, B. *Die Mannich-Reaktion.* Berlin, Springer-Verlag, 1959.

3. EIRIN, A.M.; SANTANA, L.; RAVINA, E.; FERNANDEZ, F.; SANCHEZ--ABARCA, E. & CALLEJA, J.M. Synthesis of 3-Aminomethyl-1-tetralones as potential neuroleptic agents. *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Therap.*, *13*:533, 1978.
4. GORCZYCA, M.; LUCKA-SOBSTEL, B.; ZEJC, A.; ZGORNIAK-NOWOSIELSKA, I.; MARCISZEWSKA, M. & GATKIEWITZ, A. Synthesis and in-vitro Antiviral Activity of l-Aminoalkyl Benzimidazoles. *Acta Pharm. Jugoslav.*, *28*:143, 1978.
5. KNOLL, J.; NÁDOR, K.; KNOLL, B.; HEIDT, J. & NIEVEL, J.G. Beta-Aminoketones, a New Group of Tranquilizers. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, *130*:155, 1961.
6. MAZZONE, G. & BONINA, F. Sintesi e Attività Antimicotica di 3-Metilammino derivati di Alcuni 2-Mercapto-5-aril-1,3,4-ossadiazoli. *Farmaco*, *34*:390, 1979.
7. MONTI, L. & VENTURI, M. Sopra alcuni Derivati Benzimidazolici. *Gazz. Chim. Ital.*, *76*:365, 1946.
8. NAVES, Y. R. Etudes sur les matières végétales volatiles. *Helv. Chim. Acta*, *40*:1123, 1957.
9. RAM, V.J. & PANDEY, H.N. Mannich Bases Derived from 5-(2-chlorophenyl)-3H-1,3,4-Oxadiazol-2-thione. *Eur. J. Med. Chem.-Chimica Therapeutica*, *12*:537, 1977.
10 ROTH, H.J. & MÜHLENBRUCH, B. Bildungstendenz symmetrischer bis-Mannichbasen des Piperazins. *Arch. Pharmaz.*, *303*:156, 1970.
11. A hidantoína da mentona foi sintetizada de acordo com: ROTHMAN, E.S. & DAY, A.R. Hydantoins from Alicyclic Ketones and Aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.*, *76*:111, 1954.
12. SCHINZ, H.; RUZICKA, L.; SEIDEL, C.F. & TAVEL, Ch. Produits à odeur de violette. Synthèse de la d, l-α — irone. *Helv. Chim. Acta*, *30*:1810, 1947.
13. TRAMONTINI, M. Advances in the Chemistry of Mannich Bases. *Synthesis*, 703, 1973.
14. VOGEL, A.I. *Química Orgânica*, Editora da Universidade de São Paulo, 1971, vol.1, p. 363.
15. WARE, E. Chemistry of the Hydantoins. *Chem. Reviews*, *46*:403, 1950.
16. WEITZEL, G.; SCHNEIDER, F.; SEYNSCHE, K. & FINGER, H. Cytostatische Effekte von N-C-N-Verbindungen. *Z. Physiol. Chem.*, *336*:107, 1964.
17. WINSTEAD, M.B.; BARR, D.E.; HAMEL, C.R.; RENN, D.J.; PARKER, H.I. & NEUMANN, R.M. Substitution in the Hydantoin Ring. I. N-3-Aminomethyl Derivatives. *J. Med. Chem.*, *8*:117, 1965.
18. WINTERFELD, K. & SINGH, G.B. Zur Kenntnis der Reaktionsfahigkeit des 2-Aza-3-oxoindolizidins. *Arch. Pharmaz.*, *294*:404, 1961.
19. ZELNIK, R. & RABENHORST, E. Síntese de Hidantoínas de Terpenos Carbonílicos. *An. Acad. bras. Ciênc.*, *54*:99, 1982.
20. ZINNER, H. & SPANGENBERG, B. Mannich-Basen des Benzimidazolons, ein Beitrag zum Bildungsmechanismus von N-Mannich-Basen. *Chem. Ber.*, *91*:1432, 1958.

Mem. Inst. Butantan
44/45:325-334, 1980/81

APERFEIÇOAMENTO DO PROCESSO DE HIPERIMUNIZAÇÃO ANTITETÂNICA VISANDO A OBTENÇÃO DE ANTITOXINA DE ALTA DOSAGEM

(Anotações de Relatórios de Serviço)

Sebastião de Camargo CALAZANS
Reynaldo S. FURLANETTO *

Serviço de Imunoterapia do Instituto Butantan (*)

Foi sempre grande o interesse dos pesquisadores que se dedicam ao preparo dos soros terapêuticos, a obtenção de produtos cada vez mais potentes.

Para esse fim, em numerosas publicações recentes, vem sendo feita a adição, aos antígenos, de substâncias não específicas e que se revelaram estimulantes ao aumento da produção dos anticorpos desejados.

A idéia já é antiga, porém com interpretação diferente, pois em 1889, Roux e Yersin (1), pouco tempo depois de terem descoberto a toxina diftérica observaram, em suas experiências, que o veneno elaborado pelo bacilo de Klebs-Löffler, que matava cobaias no período de 30 a 60 horas, tinha sua ação retardada quando tratado pelo cloreto de cálcio, o que levou os referidos autores a dizerem que "se a substância tóxica aderisse bastante ao corpo insolúvel, ela não se difundiria senão lentamente determinando, talvez a vacinação gradual do animal".

(*) *EXPLICAÇÃO NECESSÁRIA*

Este trabalho representa a análise das pesquisas realizadas durante os anos de 1942-1943 e 1944, no Serviço de preparo da antitoxina tetânica, e que fazem parte dos relatórios anuais, encaminhados à Diretoria do Instituto Butantan.

Não estando ainda completas nossas pesquisas, sua publicação deveria ser feita em 1945.

Acontece que, sendo um de nós, transferido para o Instituto "Adolfo Lutz", inesperadamente, e sem ao menos um simples aviso pessoal, a

* "In memorian".

organização por nós planejada, de comum acordo com a Diretoria, então em exercício e as pesquisas em andamento, foram interrompidas.

Comemorando-se porém, no corrente ano, o octogésimo aniversário da criação do Instituto Butantan, resolvemos publicar estas anotações para que ficasse documentado nas Memórias do Instituto, o que foi conseguido naqueles três anos a respeito da produção da antitoxina tetânica.

Em 1916, Le Moignic e Pinoy (2) empregaram uma vacina antitífica constituída por germes mortos pelo calor, tendo como veículo a lanolina e o óleo de oliva. Visavam realizar a vacinação antitífica com uma dose única, reunindo em uma só, a totalidade dos germes empregados nas quatro injeções em uso.

O emprego, porém, de substâncias não específicas na rotina do preparo de soros terapêuticos só foi estabelecido depois das pesquisas memoráveis e fundamentais de G. Ramon e que revolucionaram por completo os antigos processos de hiperimunização dos equinos e a profilaxia da difteria e do tétano.

Este grande e persistente pesquisador, a quem tanto devem a ciência e a humanidade, assinalou, depois de uma série de observações, "o aumento, por vezes considerável, do teor de antitoxina no soro dos cavalos que apresentavam, acidentalmente, um abcesso no ponto de injeção da toxina diftérica, durante o processo de imunização".

Atribuindo à referida reação inflamatória, a melhora do título dos soros, que vinha preparando, resolveu adicionar aos antígenos, substâncias não específicas, mas capazes de produzirem, in loco, acentuada reação semelhante a obtida acidentalmente.

Fixou-se Ramon (3), no início, no emprego da tapioca pulverizada, cuja aplicação passou a ser adotada largamente, sendo logo seguida pelo uso de cloreto de cálcio e das vacinas associadas. Por outro lado, Glenny, Pope, Waddington e Wallace (4), adicionando alúmen de potássio às toxinas, notaram o aparecimento de um precipitado insolúvel que aumentava, também, grandemente o poder antigênico das mesmas.

Mais recentemente, Ramon, em estudos realizados com seus colaboradores Lemétayer e Richou (5), mostrou ser a lanolina de grande utilidade na imunização e, em novas pesquisas ainda com Lemétayer (6), expos os resultados da imunização de carneiros e cavalos com anatoxina tetânica misturada com a referida substância. Com o emprego da lanolina, os animais não só se imunizaram rapidamente, como forneceram soro de alta dosagem.

Para Weinberg e Guillaumie (7), que compartilham da opinião de Ramon, o aumento do poder imunizante dos antígenos é devido "à reabsorção lenta e contínua do antígeno em conseqüência do seu envolvimento pela lanolina, e à forte reação local e geral do organismo, fator comum a todos os processos de imunização, mas que se manifesta, em geral, de uma maneira mais violenta, quando se emprega o processo da lanolina".

Thibaut (8), em interessantes pesquisas, estudou as modificações histológicas determinadas pela inoculação subcutânea, em cobaias, de 4 misturas diferentes, a saber:

1.º) Caldo Simples
Solução Fisiológica

2.º) Anatoxina Tetânica
Solução Fisiológica

3.º) Solução Fisiológica
Lanolina
Óleo de Oliva

4.º) Anatoxina Tetânica
Lanolina
Óleo de Oliva

Suas conclusões baseadas no estudo histológico de cortes da zona inoculada foram as seguintes: a anatoxina injetada subcutaneamente em cobaias não determina reação histológica característica, pois a reação se assemelha à produzida pelo caldo simples que é banal, leve e efêmera, ao passo que as modificações produzidas pelas misturas oleosas são profundas, com grande proliferação do tecido conjuntivo, criando uma lesão durável.

Norman (9), em 1934, empreendeu uma série de experiências nas quais estudou a influência das emulsões finamente divididas de óleos e gorduras sobre as toxinas bacterianas. Empregou para isso substâncias de origem vegetal, animal e mineral, como o óleo de oliva, o creme de leite e a parafina, emulsionadas com goma acácia, estudando sua influência sobre a ação das toxinas produzidas pelos bacilos tetânico, diftérico, perfríngico e V. Séptico.

Conclui o autor que as toxinas são adsorvidas pelas partículas oleosas e depois lentamente cedidas ao organismo e que quanto mais finas as emulsões, maior a proteção contra as doses letais das toxinas empregadas. A adição de substâncias que tornem as emulsões estáveis garante a proteção contra as toxinas, assinalando, por outro lado, que o creme de leite não tinha nenhuma ação protetora. Referiu-se ainda às experimentações que vinha fazendo a respeito da possibilidade de imunização de animais por esse processo.

Walsh e Frazer (10), independentemente do autor anterior, investigaram problemas semelhantes, inoculando em coelhos grandes doses de toxinas misturadas a emulsão de óleo de fígado de bacalhau e óleo de oliva, chegando às mesmas conclusões.

De tudo o que acima ficou exposto, devemos concluir com Ramon que é na intensa reação inflamatória local, na qual se observa o aparecimento de forte leucocitose, que deve residir a exaltação do poder imunizante dos antígenos, pelas substâncias não específicas.

Uma outra aquisição de grande valor, na produção de antitoxina tetânica, com títulos elevados foi, sem dúvida, a recomendação de Glenny, Pope, Waddington e Wallace (11) de se deixar um intervalo de 30 dias entre a primeira injeção do antígeno tetânico e do início da imunização.

Algum tempo mais tarde, Ramon e Lemétayer (12) observaram que os cavalos vacinados com duas doses de vacina antitetânica, dois anos antes, produziam antitoxina tetânica de títulos muito mais elevados.

No Instituto Butantan, tanto no preparo de soros antipeçonhentos, como no serviço de preparo do soro antidiftérico, e dos soros antianaeróbios, todas estas substâncias têm sido empregadas e com grande sucesso, tendo tais métodos sido iniciados em São Paulo, pelos saudosos amigos e colegas Lemos Monteiro e Flávio Fonseca (13).

Em 1932, Flávio Fonseca (14), então responsável pelo preparo da antitoxina tetânica, adotou a vacinação antitetânica, sistematicamente, nos animais do Instituto.

Esta prática, além de proteger os eqüinos contra o tétano, faz com que eles reajam, com muito maior intensidade, ao estímulo imunizante dos antígenos tetânicos ao serem submetidos ao processo de hiperimunização.

PREPARO DA TOXINA E DA ANATOXINA TETÂNICAS

O meio empregado para a obtenção da toxina tetânica é o que já, há muito tempo, vem sendo empregado neste Serviço, isto é, o meio de Tarozzi, constituído por caldo de coração de boi, glicosado a 1%.

Após uma série de experiências, resolvemos reduzir o pH inicial deste meio de 7,8 para 5,5, de conformidade com as pesquisas de A. Berthelot, G. Ramon e Mlle. Amoureux, julgado melhor para a produção uniforme, de uma boa toxina tetânica.

As experiências deste Serviço, neste particular, vêm sendo realizadas desde 1940, sendo tal prática empregada rotineiramente.

Outra modificação, não menos importante, foi a referente ao tempo de incubação, que era de 15 dias. Esse período hoje está reduzido, praticamente à metade, pois as filtrações são feitas no fim de 8 a 9 dias de estufa. Findo o prazo de produção da toxina, é a mesma clarificada, por meio de filtração, através de polpa de papel de filtro, colocada em funis de Büchner e em seguida filtrada em placas Zeitz E. K., e, finalmente, determinada a D.M.M., em cobaias de 350 g. Provas de pureza das culturas antes da clarificação, e da esterilidade da toxina filtrada, são feitas em todas as partidas.

Quebrando-se com certa freqüência os funis de Büchner, feitos de porcelana, esta Seção tratou de substituí-los por outros semelhantes, mas de metal, com resultados perfeitamente iguais.

Quanto ao título da toxina utilizada a D.M.M. foi de 0,0002 para cobaias de 350 g pela via subcutânea.

A anatoxina é preparada de acordo com a técnica já conhecida. Uma vez terminado o processo de desintoxicação, é feita a prova de inocuidade e verificado o poder antigênico da mesma.

As provas de inocuidade e do poder antigênico da anatoxina são feitas em duas cobaias.

As cobaias recebem, uma 5 c.c. e outra 10 c.c., pela via subcutânea. Um mês após a injeção da anatoxina, essas cobaias são inoculadas com 50 e 100 D.M.L. da toxina tetânica, respectivamente, e devem sobreviver, sem sintomas, em ambas as provas.

O título da antitoxina tetânica é determinado pelo processo de Rosenau e Anderson e expresso em unidades americanas — U.A. Uma U.A. corresponde a duas unidades internacionais — U.I.

O processo de imunização empregado para a obtenção da antitoxina tetânica consta de 3 fases, a saber:

1.ª Vacinação — (sensibilização dos animais)

2.ª Imunização de base

3.ª Hiperimunização

VACINAÇÃO

Todo animal que entra para o Instituto recebe duas doses de 25 e 50 c.c. da anatoxina tetânica, adicionada de 0,5% de alúmen de potássio, com 15 dias de intervalo, após o que é distribuído aos vários Serviços de imunização.

Transcorrido, no mínimo, um mês de intervalo após a vacinação, os cavalos encaminhados ao Serviço de produção de antitoxina tetânica serão submetidos a uma das seguintes variantes:

1.ª MODALIDADE-IMUNIZAÇÃO DE BASE

Consta de 4 injeções de anatoxina adicionada de alúmen de potássio, na proporção de 0,5% até o total de 650 cm^3, de 5 em 5 dias, sendo a primeira injeção de 50 cm^3 e a última de 300 cm^3; dosando mais de 5 U.A. por cm^3, 8 dias após a última injeção, descanso de 20 dias, quando, então, se inicia a fase de hiperimunização.

HIPERIMUNIZAÇÃO

Nesta fase os animais recebem um total de 750 cm^3 de toxina, com 0,5% de alúmen de potássio (menos na última), em injeções feitas cada 5 dias; dosando mais de 300 U.A. por cm^3, serão submetidos às sangrias definitivas.

Quantidade de antígenos empregada:

— Anatoxina	650 c.c.
— Toxina	750 c.c.
Total	1.400 c.c.

Dias decorridos até a primeira sangria definitiva: 70

CALAZANS, S. C. & FURLANETTO, R. S. Aperfeiçoamento do processo de hiperimunização antitetânica visando a obtenção de antitoxina de alta dosagem (Anotações de Relatórios de Serviço). *Mem. Inst. Butantan,* 44/45:325-334, 1980/81.

2.ª MODALIDADE

É igual à primeira, com um intervalo de oito dias entre a imunização de base e a hiperimunização.

Dias decorridos até a primeira sangria definitiva: 48

Títulos antitóxicos alcançados em alguns cavalos, nos anos de 1942, 1943 e 1944

NÚMERO DOS CAVALOS	ANOS	DOSAGEM
509	1942	2.500 U.A.
523	"	2.500 U.A.
592	"	2.500 U.A.
594	"	2.500 U.A.
500	"	3.000 U.A.
513	"	3.000 U.A.
521	"	3.000 U.A.
	1943	
521	16/4	4.000 U.A.
521	24/4	3.500 U.A.
507	24/4	4.000 U.A.
531	4/6	4.000 U.A.
554	4/6	4.000 U.A.
E-545	19/7	5.000 U.A.
E-545	13/7	6.500 U.A.
E-545	31/7	7.000 U.A.
E-545	10/8	5.250 U.A.

Em 1943, os títulos antitóxicos, obtidos no Serviço de hiperimunização antitetânica, ultrapassaram nossa expectativa, deixando mesmo em segundo plano os excelentes resultados obtidos em 1942; supomos haver conseguido o maior título antitóxico até hoje registrado na imunização contra o tétano, pois, em toda a literatura consultada não foi encontrado título de dosagem da antitoxina igual ao produzido pela égua n.º 545, de procedência nacional, que revelou conter de 3.000 a 7.000 U.A. por cm³, como se vê abaixo:

E. 545 do Serviço de Soro Antitetânico
(duas imunizações em 1943)

1.ª imunização
- 1.ª sangria = 4.000 U.A.
- 2.ª sangria = 4.500 U.A.
- 3.ª sangria = 3.500 U.A.
- 4.ª sangria = 6.000 U.A.

2.ª imunização
- 1.ª sangria = 6.500 U.A.
- 2.ª sangria = 5.000 U.A.
- 3.ª sangria = 7.000 U.A.
- 4.ª sangria = 5.500 U.A.

CALAZANS, S. C. & FURLANETTO, R. S. Aperfeiçoamento do processo de hiperimunização antitetânica visando a obtenção de antitoxina de alta dosagem (Anotações de Relatórios de Serviço). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:325-334, 1980/81.

A obtenção pela primeira vez de antitoxina com o título de 7.000 U.A. por c.c., constitui fato marcante na história da produção da antitoxina tetânica no Instituto Butantan.

Em 1944, foram também alcançados títulos altos como se vê na relação abaixo:

NÚMERO DOS CAVALOS	ANOS	DOSAGEM
	1944	
500	25/4	7.000 U.A.
544	25/4	7.000 U.A.
541	27/4	4.500 U.A.
510	27/4	4.500 U.A.
530	27/4	5.000 U.A.
563	27/4	5.000 U.A.
594	8/5	4.000 U.A.
563	8/5	4.000 U.A.
500	8/5	5.000 U.A.

Pelo que pudemos apurar, o maior título antitóxico referido na literatura é o citado por G. Ramon e Lemétayer (15) que relatam ter obtido em um grupo de 15 cavalos, previamente vacinados contra o tétano, o título máximo de 10.000 U.I. que correspondem a 5.000 U.A., em dois animais, conforme se vê a seguir:

"N.º des Chevaux	Titres des sérums	N.º des Chevaux	Titres des sérums
1	6.000 unités (0)	9	1.800 unités
2	1.200	10	2.800
3	3.000	11	6.000
4	1.500	12	3.000
5	10.000	13	6.000
6	2.600	14	10.000
7	6.000	15	6.000"
8	6.500		

(0) Unités internationales.

Citando ainda outros pesquisadores, dizem os mesmos autores por nós referidos:

"La valeur antitoxique moyenna des sérums antitoxiques préparés par S. Schmidt atteint, em 1927-1928 prés de 1.000 unités (internationales) et la valeur la plus élevés que ai été obtenue: 4.400 unités chez un Cheval. Condréa, en utilisant diverses techniques, préparé des sérums dont le titre antitoxique moyen est de 600 unités et cela aprés un temps d'hyperimmunisation beaucoup plus long et des quantités d'antigène plus considerables. Glenny, dans un article tout récent, dit avoir atteint

la moyenne de 1.600 unités (800 unités U.S.). La mise em parallèle de tous ces chiffres et resultats avec ceux fournis plus haut à propos de l'hyperimmunisation de nos quinze Chevaux donne la mesure des progrès réalises à tous points de vue, grâce aux méthodes que l'un de nous a établies ou perfectionnées durant ces six dernières années et que nous avons assotiées dans l'essai rapporté. Aux avantages qui s'attachant à la mise en ouvre de ces méthodes et aux résultats acquis: économie de temps et d'antigène, production d'antitoxine considérablement accrue, s'en ajoutent d'autres, nom moins importants qui ont trait à l'utilisation des sérums antitètaniques ainsi obtenus en thérapeutique. Par exemple, ces sérums dont la haute teneur en antitoxine spécifique peut être encore augmentée par la concentrations et la purification donnent de grandes facilités pour le traitment du tétanos déclaré, ils permettent, em effect, de réduire considérablement le volume du liquide spécifique à injectar".

Do exposto conclui-se que Ramon e Lemétayer obtiveram em 15 cavalos uma média de 2.423 U.A., sendo a dosagem máxima de 5.000 U.A., em dois cavalos. S. Schmidt obteve 2.200 U.A., em um único cavalo; Condréa, depois de um longo período de imunização, consegue uma média de 300 U.A.; Glenny, por sua vez, obteve uma dosagem média de 800 U.A.

Em nosso Serviço de rotina este ano, computando-se indistintamente todos os animais, bons e maus produtores submetidos à imunização, tivemos as seguintes dosagens:

1.ª imunização — 40 cavalos — dosagem máxima — 6.000 U.A.
dosagem média — 1.544 U.A.

2.ª imunização — 15 cavalos — dosagem máxima — 7.000 U.A.
dosagem média — 1.886 U.A.

Quadro demonstrativo das dosagens obtidas pelos autores citados e no serviço de antitoxina tetânica no Instituto Butantan

	ANOS	DOSAGEM MÁXIMA	DOSAGEM MÉDIA
SCHMIDT	1928	2.200 U.A.	500 U.A.
CONDRÉA			300 U.A.
GLENNY			800 U.A.
RAMON e LEMÉTAYER	1931	5.000 U.A.	2.423 U.A.
LEMOS MONTEIRO e FLÁVIO FONSECA	1931	1.600 U.A.	
FLÁVIO FONSECA	1932	1.600 U.A.	
CALAZANS e FURLANETTO	1942	3.000 U.A.	
CALAZANS e FURLANETTO	1943	7.000 U.A.	1.715 U.A.
CALAZANS e FURLANETTO	1944	7.000 U.A.	1.888 U.A.

CALAZANS, S. C. & FURLANETTO, R. S. Aperfeiçoamento do processo de hiperimunização antitetânica visando a obtenção de antitoxina de alta dosagem (Anotações de Relatórios de Serviço). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:325-334, 1980/81.

Vê-se que este serviço não só conseguiu bater o recorde mundial no que diz respeito à dosagem máxima, mas ainda obteve uma média geral de dosagem, num serviço de rotina, que se pode classificar de excelente.

Acreditamos que estes títulos excepcionais corram por conta do tipo de imunização, por nós adotado, além de outros fatores mencionados, como a seleção de animais bons produtores e ao alto poder imunizante dos antígenos empregado.

Do relatório anual de 1943 do Diretor do Instituto Butantan, Flávio Fonseca (16), destacamos os seguintes tópicos:

"Resultados de grande significação prática no preparo de antitoxina tetânica foram obtidos pelos Drs. Calazans e Furlanetto, os quais registraram em diferentes cavalos, títulos antitóxicos excepcionais de 3.500, 4.000, 4.500 e 5.000 unidades americanas por cm³, havendo mesmo um eqüino (a égua n.º 545, de procedência nacional), no qual se encontrou um título de 4.000-6.000 U.A., em diferentes sangrias da 1.ª imunização e de 5.000-7.000 U.A., em várias sangrias de 2.ª imunização.

Tais títulos de 6.000-7.000 U.A., como foram obtidos no animal acima referido, parecem constituir um recorde, pois RAMON e LEMÉTAYR, de grande experiência no assunto, se referem ao título máximo de 5.000 U.A., obtido em dois, de um lote de quinze eqüinos".

CONCLUSõES

1. Foram apresentados títulos de antitoxina tetânica produzida durante os anos de 1942, 1943 e 1944.

2. Em toda literatura consultada não foi encontrada antitoxina tetânica com título igual ao obtido nos eqüinos números 545, 500 e 544.

3. Por meio da refinação e concentração, essas antitoxinas poderão ter seu título ainda mais elevado, o que representará, sem dúvida, grande vantagem para o tratamento do tétano.

4. Foi ressaltada a importância da seleção de animais bons produtores na obtenção de antitoxina tetânica de altos títulos. Esses animais devem ser conservados no serviço, enquanto se acharem em boas condições.

5. Foram introduzidas modificações no processo de produção da toxina tetânica.

6. Os bons resultados obtidos podem ser atribuídos também ao alto poder imunizante dos antígenos empregados.

AGRADECIMENTOS

Não podemos terminar este trabalho sem prestar um sentido culto de saudade ao nosso amigo e companheiro de trabalho REYNALDO FURLANETTO, inteligência brilhante e dotado de notáveis qualidades de pesquisador, tão prematuramente desaparecido.

CALAZANS, S. C. & FURLANETTO, R. S. Aperfeiçoamento do processo de hiperimunização antitetânica visando a obtenção de antitoxina de alta dosagem (Anotações de Relatórios de Serviço). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:325-334, 1980/81.

Aos queridos auxiliares JOÃO FERNANDES e ANTENOR MARCONDES, nosso preito de grande saudade.

A nossa prezada e inteligente colaboradora EMMA DE LIMA, inexcedível no cumprimento do dever, o nosso muito obrigado.

CONCLUSIONS

1. Titles of tetanic antitoxin produced during the years of 1942, 1943 and 1944 have been presented.

2. It has not been found, in all literature consulted, tetanic antitoxin with titles similar to the ones obtained in the horses number 545, 500 and 544.

3. By means of refinement and concentration these antitoxines may have titles yet higher than the ones here obtained what will be of great advantage in the treatment of tetanus.

4. The importance of a selection of good animal productors in the obtainance of tetanic antitoxin of high titles has been emphasized. Those animals should be left in condition of subsequent immunization while they are sound.

5. Modifications in the process of tetanic toxin have been introduced.

6. The good results that have been obtained may be due to the high immunization power of the antigenic employed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROUX, E. & YERSIN, A I. Pasteur, 1889.
2. Le MOIGNIC & PINOY *C.R. Soc. Biol.*, *29*:201 e 352, 1916.
3. RAMON, G. *C.R. Soc. Biol.*, *93*:506, 1925.
4. GLENNY, A.T.; POPE, C.G.; WADDINGTON, H. & WALLACE, U. *J. Path. Bact.*, *29*:38, 1926.
5. RAMON, G.; LEMÉTAYER, E. & RICHOU, R. *C.R. Soc. Biol.*, *115*, 1934; *Rev. Immunol.* (Paris), *1*:199, 1935.
6. RAMON, G. & LEMÉTAYER, E. *C.R. Soc. Biol.*, *119*:248, 1935.
7. WEINBERG, M. & GUILLAUMIE, M. *C.R. Soc. Biol.*, *119*:719, 1935.
8. THIBAULT, P. *Rev. Immunol.* (Paris), *2*:508, 1936.
9. NORMAN MYERS, G. *J. Hyg.*, *34*:250, 1934.
10. WALSH, V.G. & FRAZER, S.C. *Brit. Med. J.*, *1*:557, 1934.
11. GLENNY, A.T.; POPE, C.G.; WADDINGTON, H. & WALLACE, U. *J. Path. Bact.*, *28*:463, 1925.
12. RAMON, G. & LEMÉTAYER, E. *C.R. Soc. Biol.*, *106*(1):21, 1931.
13. LEMOS MONTEIRO, J. & FONSECA, F. *Mem. Inst. Butantan*, *6*:267, 1931.
14. FONSECA, F. *Mem. Inst. Butantan*, *7*:303, 1932.
15. RAMON, G. & LEMÉTAYER, E. *C.R. Soc. Biol.*, *106*(1):23, 1931.
16. FONSECA, F. Relatório Anual do Diretor do Instituto Butantan, 1943.

Mem. Inst. Butantan
44/45:335-341, 1980/81

RELAÇÕES ENTRE O EMPREGO DE ANATOXINA DIFTÉRICA BRUTA E O TESTE DE SCHICK EM CAVALOS HIPERIMUNIZADOS

Joana Akiko FURUTA *
Célia LIBERMAN *
Raymundo ROLIM ROSA ****
Edison Paulo Tavares de OLIVEIRA **
Frederico Fontoura LEINZ ***
Hideyo IIZUKA *

RESUMO: Cavalos submetidos previamente ao teste de Schick foram estimulados sete vezes com anatoxina diftérica fluida adsorvida pelo alúmen a fim de se estudar os níveis de antitoxina produzidos.

Observou-se que a freqüência dos títulos antitóxicos individuais maiores ou iguais à 500 UI/ml, bem como os títulos médios foram mais elevados no lote de eqüinos Schick negativos.

Desta forma, o aproveitamento para a produção de soros antidiftéricos será maior quando da utilização de animais Schick negativos.

PALAVRAS-CHAVE: Anatoxina diftérica; antitoxina diftérica; produção de soro antidiftérico em cavalos; reimunizações repetitivas.

INTRODUÇÃO

A produção de soro antidiftérico tem sido alvo de inúmeros estudos desde 1908, quando BELLA SCHICK [13], introduziu uma intradermo reação que permitiu detectar a presença de antitoxina diftérica circulante. Esta reação consistia na inoculação de baixas doses de toxina diftérica pela via intradérmica.

HITCHENS e TINGLEY [8], em 1917, adaptaram esta reação ao cavalo a fim de observar a existência de uma provável imunidade natu-

* Seção de Toxinas e Anatoxinas
** Chefe da Seção de Toxinas e Anatoxinas
*** Serviço Agrícola
**** Diretor do Serviço de Imunologia

ral. SORDELLI [15], em 1921, conseguiu a preparação de um soro com alto teor de antitoxina diftérica, utilizando cavalos Schick negativos.

Em 1921/6, GLENNY [5, 7] propôs a utilização de cavalos originalmente Schick negativos para a rápida obtenção de soros hiperimunes, fato corroborado depois por RAMON [10] em 1929.

Quanto ao antígeno a ser administrado, GLENNY [6] referia que o precipitado obtido pela adição do alúmen a este, provocava em cobaias uma exacerbação significativa do poder imunogênico, quando comparado ao da anatoxina diftérica sem o adjuvante.

Já em 1959, RELYVELD [12] estudou a produção de anticorpos em cavalos com e sem imunidade natural, utilizando como antígeno a anatoxina diftérica purificada e adsorvida por fosfato de cálcio.

Fundamentados nas pesquisas dos autores citados propõe-se um estudo sobre a dinâmica da anticorpogênese, bem como o seu comportamento em cavalos soroprodutores, previamente selecionados pelo teste de Schick, no decorrer de uma série de reimunizações com anatoxina diftérica não purificada adsorvida pelo alúmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno — Foi preparado a partir do cultivo da estirpe de *Corynebacterium diphtheriae*, Park Williams 8, variedade Toronto, em meio de cultura F-20 [17]. A toxina produzida, liberada nesse meio, foi separada da massa bacteriana por meio de filtração esterilizante em placas Seitz, tipo EKS. A seguir foi destoxificada através da adição de formol na concentração final de 0,5% e incubada durante um período de 30 dias, à 37°C em estufa bacteriológica.

A seguir, o antígeno foi diluído de forma a conter 40 Lf/ml. Para cada cavalo foram utilizadas 750 ml de anatoxina diftérica fluida, seguida de 2100 ml de anatoxina diftérica adsorvida com alúmen de potássio, na concentração final de 0,5%.

Animais — Foram selecionados cavalos considerados hígidos pelo Serviço de Veterinária do Instituto Butantan, pesando aproximadamente 500 kg, separados em dois lotes de cinco animais cada, de acordo com o resultado do teste de Schick.

Os animais permaneceram durante todo o período do experimento na Fazenda São Joaquim deste Instituto, localizada no município de São Roque no Estado de São Paulo.

Teste de Schick — Foi utilizada uma toxina diftérica preparada no Instituto, conforme técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde [16]. O produto, diluído de tal forma à conter 1 D.M.M./cobaia, foi inoculado, por via intradérmica, na região correspondente à tábua do pescoço do cavalo previamente depilada. [4, 14, 18]

Após 48 horas, a reação que resultou na formação de um edema, foi medida através de um paquímetro, comprimindo-se a região testada entre os dedos polegar e indicador.

O teste foi considerado positivo quando, a diferença entre a espessura da derme medida antes do teste e, a provocada pela reação foi igual ou superior a 3 mm. Esta ocorrência indicou que o animal não apresentou imunidade natural. Na ausência do edema, o teste foi considerado negativo, revelando, provavelmente, a presença de antitoxina diftérica.

Toxina diftérica padrão — A toxina padrão, utilizada para doseamento do teor de antitoxina diftérica contida nas amostras de soro hiperimune, procedentes das sangrias exploradoras, foi preparada no Instituto Butantan. A padronização foi realizada frente à antitoxina diftérica padrão internacional.

Antitoxina diftérica padrão — o soro padrão utilizado para a padronização da toxina diftérica procedeu do "International Laboratories for Biological Standards" do Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark.

Esquema de imunização — Os dois grupos de cavalos, tanto Schick negativo como o Schick positivo, foram imunizados inicialmente por via intramuscular, na região dorsal mediana, com anatoxina diftérica fluida e em seguida com anatoxina diftérica adsorvida pelo alúmen. O antígeno foi administrado em volumes crescentes. A primeira fase consumiu 28.900 Lf de imunógeno; a segunda, 42.200 Lf, perfazendo ao final de oito semanas de imunização um total global de 71.800 Lf de toxina diftérica. A freqüência das inoculações e respectivos volumes respeitaram o esquema preconizado por OLIVEIRA [9].

Em seguida, os animais permaneceram em repouso durante um período mínimo de 30 dias [2]. Iniciou-se portanto a reimunização. Nesta fase, cada um dos eqüinos receberam um total de 40.000 Lf de anatoxina adsorvida pelo alúmen, também administrada em doses gradativamente crescentes [9].

Na última semana de imunização foi executada uma sangria exploradora de cada cavalo a fim de se determinar o título de antitoxina diftérica circulante. De acordo com o resultado do doseamento, ou seja, títulos iguais ou superiores a 500 UI/ml, os animais foram sangrados na proporção de 4% do seu peso corporal, fracionados em três vezes, com intervalos de dois dias entre cada sangria.

Terminada a última operação, os eqüinos permaneceram em repouso durante um período mínimo de 60 dias. Após cada etapa de sangria e repouso, repetiu-se o processo de reimunização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas sete sangrias exploradoras nos dois lotes de cinco cavalos.

A primeira imunização denominamos imunização de base, por constituir-se no primeiro contato dos animais com a anatoxina diftérica, independente do fato de estes possuírem ou não imunidade natural.

O comportamento sorológico do lote Schick positivo está delineado na Tabela 1, onde observamos que a média dos títulos antitóxicos inicial foi de 640 UI/ml. Este valor foi decrescendo até 280 UI/ml na sétima imunização.

TABELA 1

Níveis de antitoxina diftérica observados em lote de cavalos Schick positivos, no decurso de sete imunizações

Cavalo n.º	Níveis de antitoxina diftérica em UI/ml — Hiperimunizações						
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª	7.ª
980	400	500	400	400	300	200	200
322	800	400	500	500	600	500	500
433	1000	600	500	500	400	300	200
998	200	800	400	400	400	500	400
446	800	800	700	500	100	100	100
Médias	640	620	500	460	360	320	280

Os cavalos Schick negativos, por sua vez, responderam ao primeiro estímulo com um título médio de 1.000 UI/ml. Esta média foi declinando no decorrer das hiperimunizações até 480 UI/ml. Na sexta estimulação houve uma elevação para 680 UI/ml, conservando-se nesse nível até o final do experimento, conforme indica a Tabela 2.

TABELA 2

Níveis de antitoxina diftérica observados em lote de cavalos Schick negativos, no decurso de sete imunizações

Cavalo n.º	Níveis de antitoxina diftérica em UI/ml — Hiperimunizações						
	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	5.ª	6.ª	7.ª
413	1000	500	700	400	200	300	200
188	1400	1100	900	1100	900	1100	1000
684	1000	800	800	700	500	1000	1200
558	400	700	600	500	500	700	600
18	1200	600	600	700	300	300	400
Médias	1000	740	710	680	480	680	680

O comportamento diferenciado de cada lote de animais, diante de cada estímulo antigênico, no transcorrer das sete imunizações, está representado na Figura 1.

FURUTA, J. A.; LIBERMAN, C.; OLIVEIRA, E. P. T.; LEINZ, F. F.; IIZUKA, H. & ROLIM, R. Relações entre o emprego de anatoxina diftérica bruta e o teste de Schick em cavalos hiperimunizados. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:335-341, 1980/81.

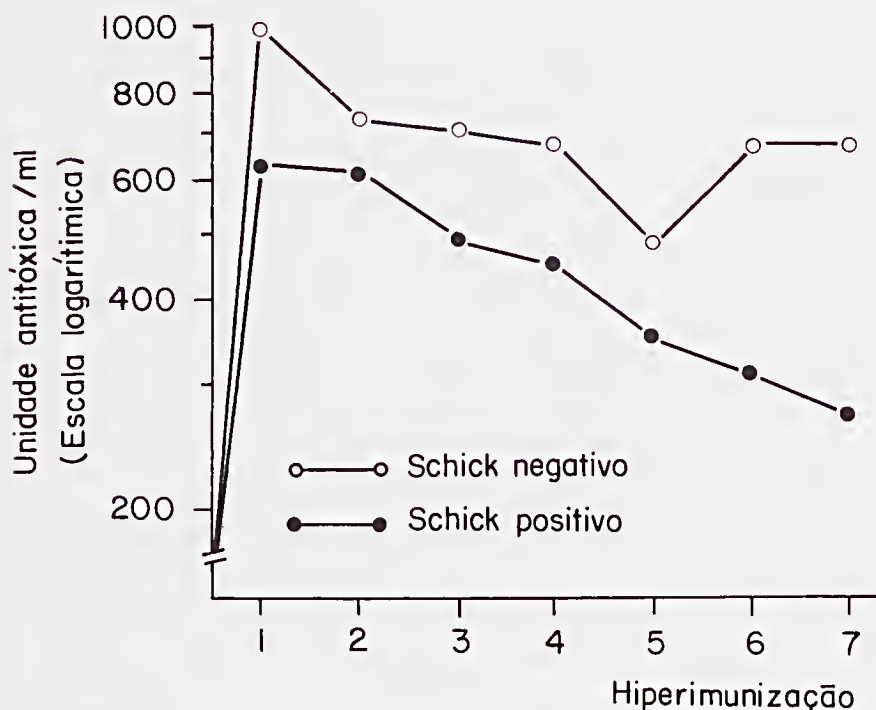



Fig. 1 — Dinâmica da síntese de anticorpos.

A freqüência dos títulos individuais de antitoxina diftérica foi também levantada e analisada na Tabela 3, pois, dentro da rotina do Instituto Butantan, para produção de soro antidiftérico, selecionam-se, para sangria, apenas eqüinos que apresentem títulos iguais ou superiores a 500 UI/ml.

TABELA 3

Freqüência dos níveis individuais de antitoxina diftérica observados em cavalos Shick positivos e negativos no decurso de sete imunizações.

Título	Schick positivo		Schick negativo	
UI/ml	n.º	%	n.º	%
< 500	18	51,43	8	22,86
≥ 500	17	48,57	27	77,14
Total	35	100,00	35	100,00

Os valores individuais no grupo Schick negativo iguais ou acima de 500 UI/ml ocorreram em 77,14% enquanto que no outro grupo, a freqüência foi de 48,57%.

O comportamento dos títulos diante do teste de Schick aqui descritos corroboram os estudos de GLENNY [5] e RAMON [10], onde a presença de antitoxina diftérica, adquirida previamente de maneira natural, concorre para a obtenção de níveis elevados de antitoxina após a imunização com anatoxina diftérica.

CELAREK e POREBSKI [3] referiram, quando da primeira hiperimunização, títulos médios de 1.000 UI/ml e 250 UI/ml para o lote de cavalos Schick negativo e Schick positivo, respectivamente.

Enquanto o primeiro valor revelou-se equivalente ao aqui descrito, o segundo nível antitóxico foi inferior à média obtida, não somente na primeira sangria (640 UI/ml), como também às subseqüentes (Tabela 1), onde observamos 280 UI/ml na última hiperimunização.

Outrossim, considerando como viáveis para processamento em escala industrial níveis séricos individuais iguais ou superiores à 500 UI/ml, verifica-se uma freqüência destes títulos maior até a sétima e última hiperimunização no grupo Schick negativo, e até a quarta no Schik positivo, divergindo dos achados de AMARAL [1] que alcançou o valor médio de 380 UI/ml na primeira imunização, preconizando nesta a sangria branca, pois os animais não alcançavam os mesmos índices nos estímulos subsequentes.

CONCLUSõES

Nas hiperimunizações sucessivas com anatoxina diftérica adsorvida pelo alúmen, a utilização de animais Schick negativos proporciona títulos mais elevados, confirmando os resultados verificados pela maioria da literatura pertinente.

O método de hiperimunização adotado permitiu o estudo da síntese de anticorpos com o decorrer de seguidas etapas de imunização objetivando uma contribuição à produção rotineira de soros.

Pretendeu-se delinear um quadro útil, sob o ponto de vista operacional visando orientar o setor de imunização na seleção de eqüinos produtores de antitoxina diftérica.

A rentabilidade dos animais foi maior já que as reimunizações proporcionaram títulos satisfatórios tanto nos cavalos Schick negativos como Schick positivos para o processamento industrial.

ABSTRACT: Horses submitted to previous Schick test had challenged seven times with crude diphteria anatoxin absorbed by alumen to study antitoxin levels produced.

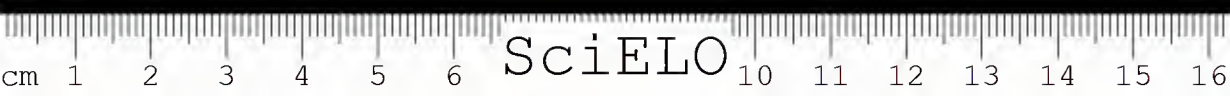
The frequency of individual antitoxin titres equal or higher than 500 UI/ml and the medium titre was superior in the Schick negative group.

So, the yield of the animals for the antitoxin diphtheria production in repetitive imunizations will be higher when Schick negative horses are used.

KEYWORDS: Diphtheria anatoxin; diphtheria antitoxin; antitoxin production in horses; repetitive reimmunizations.

FURUTA, J. A.; LIBERMAN, C.; OLIVEIRA, E. P. T.; LEINZ, F. F.; IIZUKA, H. & ROLIM, R. Relações entre o emprego de anatoxina diftérica bruta e o teste de Schick em cavalos hiperimunizados. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:335-341, 1980/81.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, J.P. O emprego de lanolina na imunização de cavalos para produção de antitoxina diftérica. *Mem. Inst. Butantan, 12*:259-264, 1938/1939.
2. BARR, M. & GLENNY, A.T. Some practical applications of immunological principles. *J. Hyg. (Lond), 44*:135-142, 1945.
3. CELAREK, J. & POREBSKY, W. Reaction de Schick appliquée a la production des sérum chez les chevaux. *C.R. Soc. Biol. (Paris), 99*:1017-1018, 1928.
4. GIRARD, O. Preparation du sérum antidiphthérique. *Maroc. Med., 42*: 367-372, 1963.
5. GLENNY, A.T. Diphteria antitoxin in the blood of normal horses. *J. Path. Bact., 28*:241-250, 1925.
6. GLENNY, A.T.; POPE, C.G.; WADDINGTON, H. & WALLACE, U. Immunological notes. Note XXIII: The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alumen. *J. Path. Bact., 29*:38-39, 1926.
7. GLENNY, A.T. & SÜDMERSEN, H.J. Notes on the production of immunity to diphtheria toxin. *J. Hyg. (Lond), 20*:176-220, 1921.
8. HITCHENS, A.P. & TINGLEY, E.K. The selection of horses for production of diphtheria antitoxin by an intrapalpebral toxin test. *J. Immunil.*, 2: 395-397, 1917.
9. OLIVEIRA, E.P.T. Estudo sobre a preparação do soro antibotulínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan, 36*:1-40, 1942.
10. RAMON, G. Essais sur l'immunité antitoxique. De l'aptitude des animaux a la production des antitoxines. *C. R. Soc. Biol. (Paris), 100*:485-487, 1929.
11. RAMON, G. Floculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine diphthériques. *C. R. Soc. Biol. (Paris), 86*:661, 1922.
12. RELYVELD, E.H. *Toxine et antitoxine diphthériques. Étude immunologique.* Paris, Herman, 1959.
13. SCHICK, B. Kutanreaktion bei Impfung mit Diphterietoxin. *Münch. Med. Wschr., 55*:504, 1908.
14. SCHOENING, H.W. The presence of diphtheria antitoxin in the blood of certain normal horses and its demonstration by the Schick test. *J. Am. vet. med. Ass., 61*:286-294, 1922.
15. SORDELLI, A. Preparation rápide des sérum antidiphtériques de haute valeur. *C. R. Soc. Biol. (Paris), 85*:314-315, 1921.
16. U. S. Public Health Service. *Minimum Requirements:* Diphtheria toxin for Schick test. Bethesda, M.D. National Institutes of Health, 1948.
17. WADSWORTH, A.B. *Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of New York State Department of Health.* 3.ª ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947. p. 624.
18. ZINGHER, A. Practical applications and uses of the Schick test. *Jour. Lab. clin. Med., 6*(3):117-123, 1920.

Mem. Inst. Butantan
44/45:343-353, 1980/81

BIONOMIA DOS TRIATOMÍNEOS — O SURGIMENTO DE ADULTOS NAS COLÔNIAS DE *PANSTRONGYLUS MEGISTUS* (BURM, 1835). (HEMIPTERA, REDUVIIDAE) *

Therezinha J. HEITZMANN-FONTENELLE **

Associando-me às comemorações do 80.º aniversário do Instituto Butantan, reverencio a memória de Arthur Neiva, grande pesquisador e diretor desta instituição, no período de 1919 a 1921.

RESUMO: Durante nove anos de criação contínua de *Panstrongylus megistus*, foram observados, além de outros dados bionômicos já parcialmente publicados (2), dois fatos novos: 1.º) o surgimento de adultos revelou-se sazonal (primavera-verão) ainda que a fase ninfal fosse aumentada, por vezes, para até mais de quatro anos e revelou-se independente da época de eclosão das ninfas e 2.º) a reprodução continuada, por várias gerações, de indivíduos oriundos de uma mesma estirpe de insetos, mostrou indícios de esgotamento genético, traduzido por retardamento no desenvolvimento, com maior duração dos estádios ninfais, redução na fase adulta da vida das fêmeas, no número de posturas, no número de ovos por postura e no percentual de ovos viáveis.

PALAVRAS-CHAVE: *Panstrongylus megistus*, bionomia.

INTRODUÇÃO

Em 1914, o Dr. Arthur Neiva escolheu para sua tese de livre-docência da Cadeira de História Natural Médica e Parasitologia o tema "Revisão do gênero *Triatoma* Lap.". Na primeira parte da tese, ele trata genericamente da bionomia dos triatomíneos. Quase 60 anos após, iniciei pesquisas bionômicas com triatomíneos no Instituto Butantan. O presente trabalho é uma coletânea de dados sobre os adultos de *Panstrongylus megistus*, feita durante nove anos de criação.

---

* Trabalho efetuado com auxílio do CNPq.
** Seção de Parasitologia do Instituto Butantan.

MATERIAL E MÉTODO

O material original era oriundo das seguintes regiões: São José do Rio Pardo, SP; Itapecerica da Serra, SP e de origem desconhecida, recebido da Escola de Saúde Pública do Rio de Janeiro.

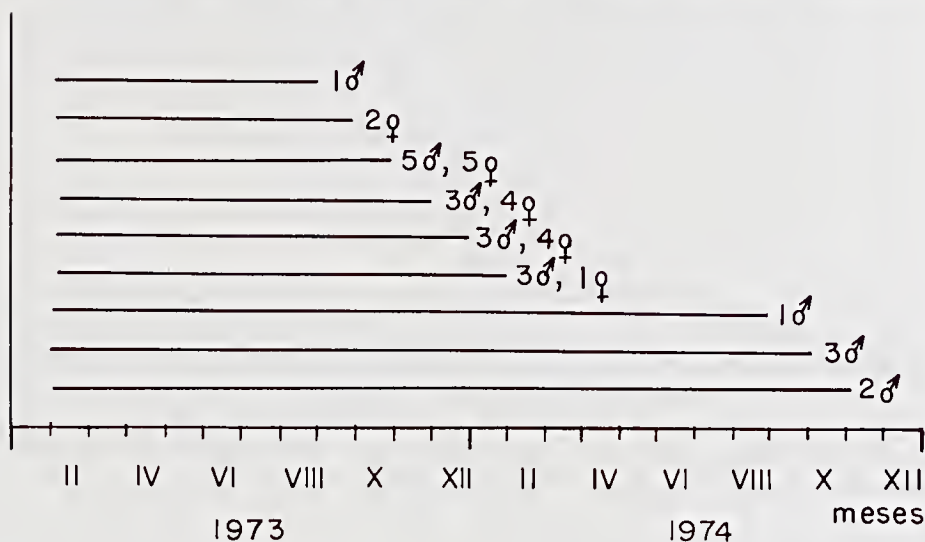
Em 1973, iniciei a criação, em condições laboratoriais, desta espécie de triatomíneo, com um lote de 40 ninfas que completou seu ciclo evolutivo (ovo-morte) em dois anos (2). A partir de descendentes desse primeiro lote e de descendentes dos adultos recebidos das localidades acima referidas, prossegui na criação desta espécie, coletando, sempre, dados sobre sua bionomia.

COMENTÁRIOS

Do primeiro lote de 40 ninfas, iniciado em fevereiro de 1973, a partir de fêmea recebida de São José do Rio Pardo, obtive 21 machos e 16 fêmeas. O primeiro adulto surgiu em agosto do mesmo ano (um macho), aumentando a ocorrência nos meses seguintes: 2 fêmeas em setembro, 5 machos e 5 fêmeas em outubro, 3 machos e 4 fêmeas em novembro, 3 machos e 4 fêmeas em dezembro e 3 machos e uma fêmea em janeiro. Nessa época as ninfas remanescentes, em número de seis, já estavam no Estádio V, pré-adultas, e poderiam ter acompanhado a evolução das demais ninfas, mas sua evolução foi retardada como que em diapausa, e atravessara o ano nessa fase, vindo a sofrer a última ecdise um ano após, na mesma época em que surgiram os primeiros adultos: um macho em agosto, 3 machos em setembro e 2 machos em outubro (gráfico I e tabela III).

GRÁFICO I

DURAÇÃO DA FASE NINFAL DE *Panstrongylus megistus*

HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia dos triatomíneos — O surgimento de adultos nas colônias de *Panstrongylus megistus* (Burm. 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45:* 343-353, 1980/81.

Em 1974, selecionei 43 ninfas eclodidas no inverno (junho/julho) e 70 ninfas eclodidas no verão (novembro/dezembro), todas descendentes de acasalamentos da criação anterior. Das ninfas eclodidas em junho/julho, obtive 21 machos e 8 fêmeas, com o surgimento dos primeiros adultos em setembro do ano seguinte (1975): 5 machos e 2 fêmeas em setembro, 2 machos e uma fêmea em outubro, 2 machos e 3 fêmeas em novembro e um macho em dezembro. As ninfas restantes, das quais seis já no Estádio V, sofreram a última ecdise apenas no ano seguinte (1976) dando 8 machos em setembro, 2 machos em outubro, 2 fêmeas em novembro e uma fêmea em dezembro (gráfico II).

Do lote eclodido em novembro/dezembro, obtive 25 machos e 24 fêmeas, com o aparecimento dos primeiros adultos em novembro do ano seguinte (um macho e uma fêmea); em janeiro de 1976 obtive mais um macho. A nova temporada de aparecimento de adultos foi de setembro de 1976 a janeiro de 1977, assim distribuídos: 9 machos e 1 fêmea em setembro, 3 machos e 9 fêmeas em outubro, 2 machos e 3 fêmeas em novembro, 2 fêmeas em dezembro e um macho e 2 fêmeas em janeiro. Nova parada no aparecimento de adultos até setembro dando 7 machos e 4 fêmeas em setembro e um macho e 2 fêmeas em outubro. O último adulto deste lote só surgiu em novembro de 1978 (um macho) após quatro anos de vida ninfal (gráfico II).

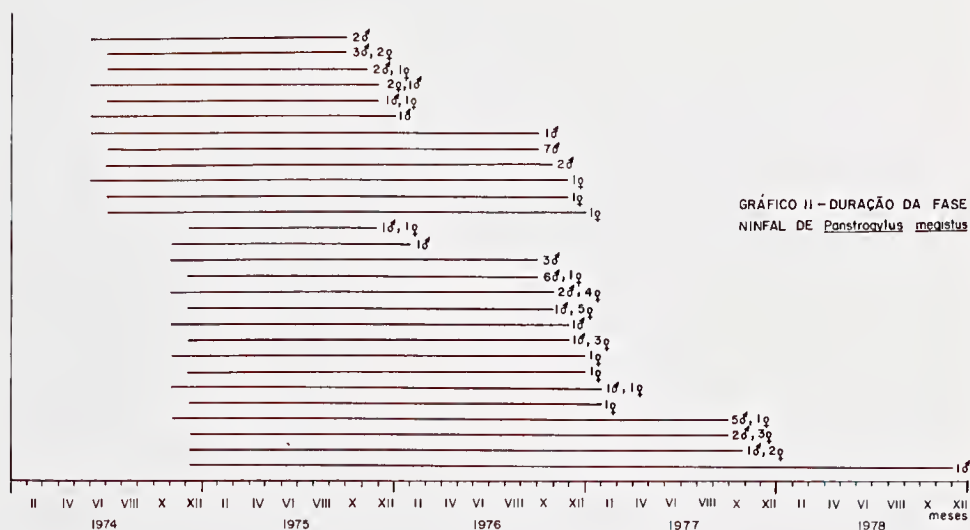
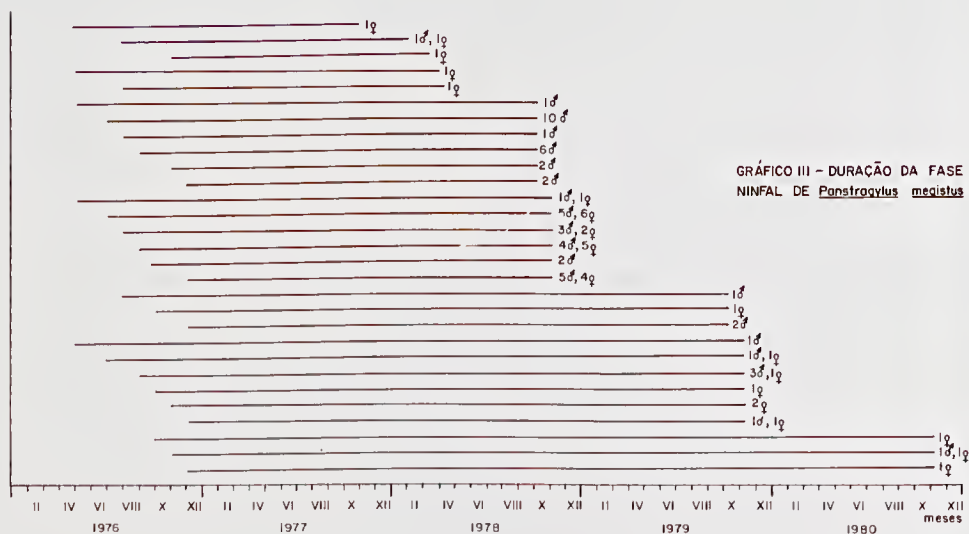
GRÁFICO II – DURAÇÃO DA FASE NINFAL DE *Panstrogylus megistus*

Em 1976, foram observados lotes com início em maio, julho, agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro que deram um total de 53 machos e 33 fêmeas. O primeiro adulto surgiu em outubro do ano seguinte — uma fêmea —, resultante de ninfa desalagada em maio. Em 1978, obtive: um macho e uma fêmea (de desalagamento em agosto) em janeiro; uma fêmea (do lote desalagado em outubro) em fevereiro e 2 fêmeas (dos lotes de maio e agosto) em março. A partir deste mês, houve uma parada no aparecimento de adultos que só voltaram a surgir em setembro (22 machos) e outubro (20 machos e 18 fêmeas). Houve uma nova parada no aparecimento de adultos até setembro do ano seguinte (1979): 3 machos e uma fêmea em setembro, 6 machos e 6 fêmeas em outubro. As ninfas restantes só alcançaram a fase adulta em outubro do ano seguinte (1980): um macho e 3 fêmeas de lotes desalagados em outubro, novembro e dezembro de 1976 (gráfico III).

GRÁFICO III – DURAÇÃO DA FASE NINFAL DE *Panstrongylus megistus*

Durante o ano de 1977, foram observados lotes iniciados de janeiro a maio, agosto, setembro, novembro e dezembro. Obtive até novembro de 1981, data em que encerrei as observações para a presente nota, pois ainda havia ninfas em observação, 35 machos e 46 fêmeas. Os primeiros adultos de lotes iniciados de janeiro a março, começaram a surgir em

setembro do ano seguinte (1978): 3 machos e uma fêmea em setembro, 5 machos e 10 fêmeas em outubro, um macho e duas fêmeas em novembro e 2 fêmeas em dezembro. Em 1979, obtive um macho e 4 fêmeas em janeiro (do lote iniciado em janeiro de 1977), uma fêmea em março (do lote de abril). Depois houve uma parada no aparecimento de adultos até setembro: 6 machos e uma fêmea em setembro, 3 machos e 10 fêmeas em outubro, um macho e uma fêmea em novembro e uma fêmea em dezembro. Em 1980, obtive 24 adultos: uma fêmea em janeiro, uma fêmea em fevereiro, 3 machos em setembro, 10 machos e 7 fêmeas em outubro e 3 fêmeas em novembro. O lote iniciado em novembro, teve os primeiros adultos em setembro de 1980. Em 1981, obtive uma fêmea em janeiro, 2 machos em setembro e uma fêmea em outubro (gráfico IV).

Em 1978, observei dois lotes: um iniciado nos dois primeiros meses do ano e outro iniciado nos dois últimos meses. No primeiro lote, o surgimento de adultos teve início em outubro de 1980 (2 fêmeas); em 1981, obtive 2 machos em setembro e um macho em outubro (gráfico V).

Do lote iniciado no final do ano, os primeiros adultos, também começaram a surgir em outubro de 1980 (uma fêmea). No ano seguinte, surgiram 2 fêmeas em fevereiro, uma fêmea em maio, 14 machos e uma fêmea em setembro, 3 machos e 10 fêmeas em outubro e 3 fêmeas em novembro (gráfico V). Devo salientar, que grande número das ninfas não atingiu o estádio adulto até o final de novembro de 1981, prazo de encerramento das observações aqui relatadas.

Das criações iniciadas em 1979, apenas uma delas, iniciada em janeiro, já apresentou adultos em 1981: 3 machos em setembro, um macho e uma fêmea em outubro e 3 fêmeas em novembro (gráfico V).

As criações iniciadas em 1980 e 1981 não foram incluídas neste trabalho, por não ter surgido adultos até novembro de 1981.

Outro fato que merece ser comentado é que, em 1973, no primeiro lote criado, a fase ninfal da maioria das observações foi bastante curta, de seis meses a um ano. Esse fato nunca mais se repetiu e fases ninfais de um ou dois anos passaram a ser menos freqüentes, aumentando o número de observações com fase ninfal de três a quatro anos (gráficos I a V).

Quanto à fase adulta, também houve modificações com a criação continuada: houve um encurtamento na sua duração. Na tabela I estão anotadas as longevidades dos machos nas criações feitas entre 1973 e 1977. Vê-se que um período adulto de 41 a 50 dias foi raro na primeira criação e já bem mais freqüente nas criações dos demais anos. Na primeira criação, a maioria de machos teve uma fase adulta entre 51 e 70 dias. Já nas criações feitas no ano seguinte, embora se tenha conseguido a maior longevidade para os machos (158 dias), 36% das observações tiveram uma fase adulta no intervalo de 31 a 60 dias. Essa mesma faixa de tempo para a vida adulta foi confirmada nos anos seguintes: 54,7% nas criações iniciadas em 1976 e 64,7% nas criações iniciadas em 1977.

Nas fêmeas, essa redução no tempo de duração da fase adulta foi mais acentuada. Na primeira criação, 56,2% dos casos teve uma fase adulta com mais de 141 dias. Essa percentagem baixou para 23,5%,

HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia dos triatomíneos — O surgimento de adultos nas colônias de *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45:* 343-353, 1980/81.

HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia dos triatomíneos — O surgimento de adultos nas colônias de *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45:* 343-353, 1980/81.

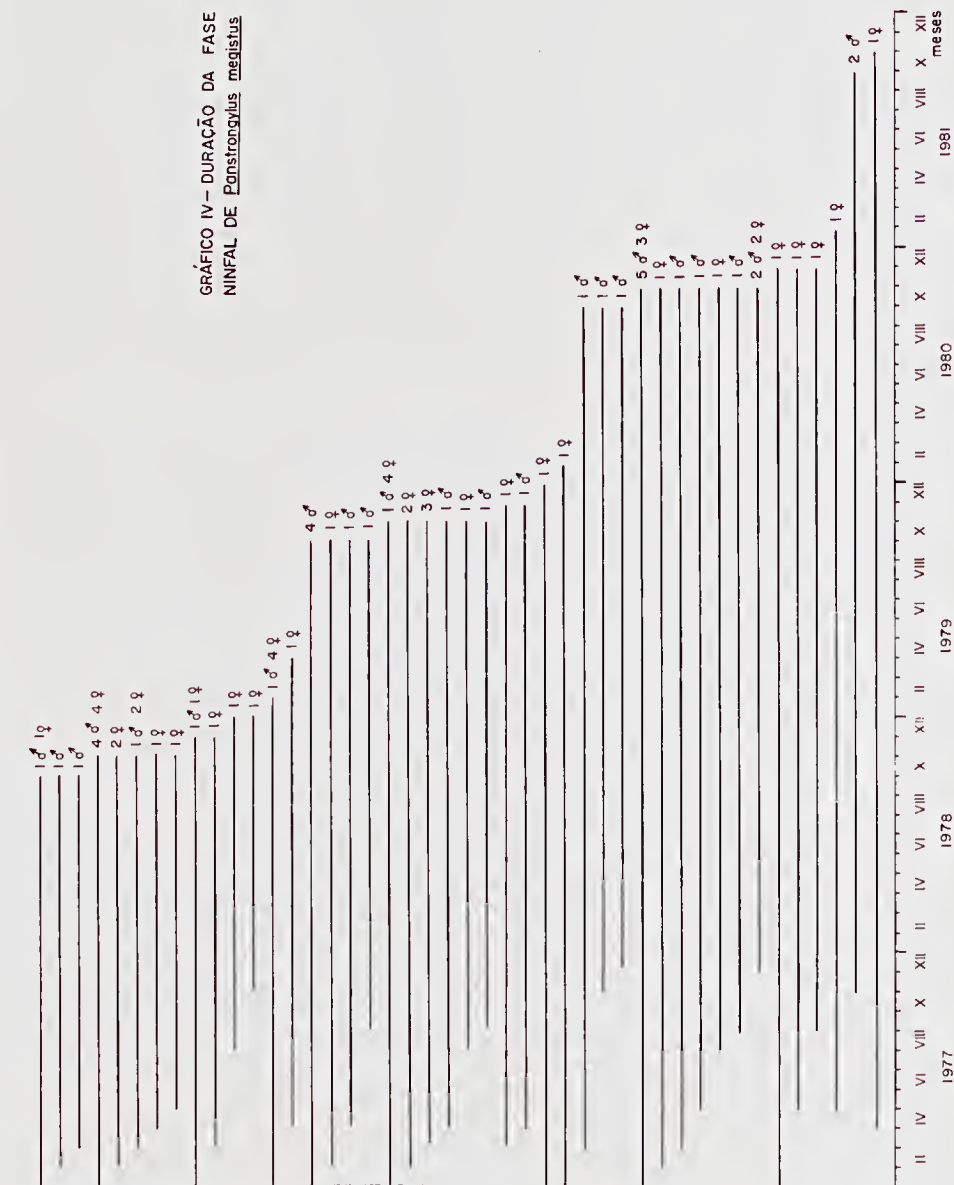
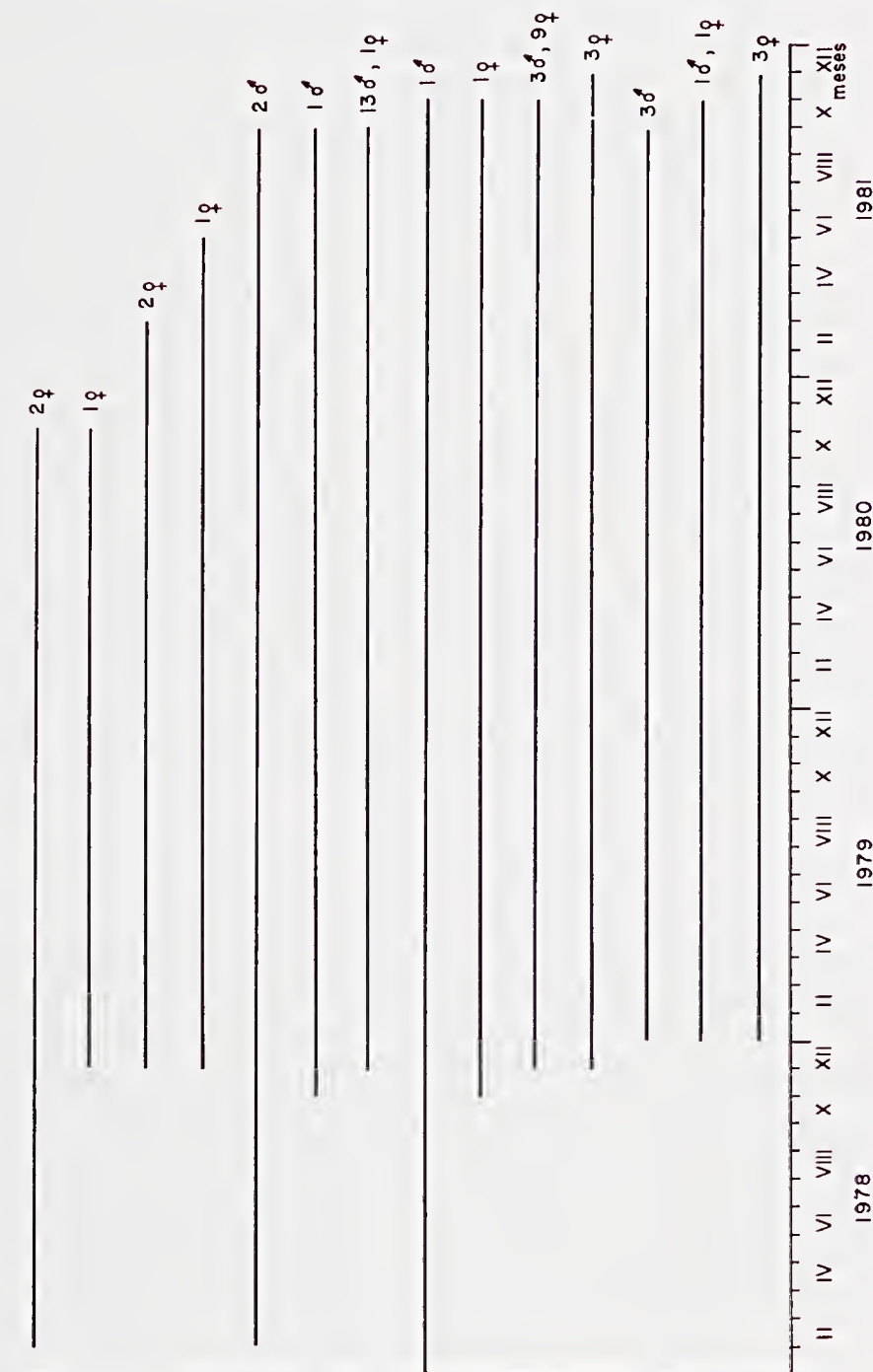



GRÁFICO V — DURAÇÃO DA FASE NINFAL DE Panstrongylus megistus.

18,1% e 2,2% nos anos seguintes. Em 1974, 32,3% das fêmeas tiveram uma fase adulta na faixa de 71 a 100 dias; no ano seguinte, 33,9% das fêmeas tiveram uma fase adulta entre 41 e 70 dias e, em 1977, 48,8% das fêmeas tiveram uma fase adulta entre 31 e 60 dias.

Com essa redução na fase adulta das fêmeas, a sua fecundidade e fertilidade diminuíram. Além disso, houve uma redução nas oviposições das fêmeas de maior fase adulta tanto em quantidade como na freqüência de ovos viáveis e o desalagamento de ninfas resistentes também baixou bastante.

Das 16 fêmeas do primeiro lote, 8 não foram acasaladas, mas 6 delas produziram óvulos em quantidade razoável. Das 8 fêmeas acasaladas, 4 também elaboraram óvulos. O início das posturas foi a partir do 20.º dia de vida adulta.

Das 8 fêmeas acasaladas, sendo que 4 delas tardiamente, obtive 731 ovos sendo que 63 deles foram eliminados logo após a postura e dos restantes desalagaram 452 ninfas.

Das 34 fêmeas dos lotes iniciados em 1975, o quadro já foi bastante diferente: as 8 fêmeas obtidas do lote de inverno foram acasaladas, sendo que 3 delas por 2 vezes. Obtive 265 ovos e destes 122 ninfas. Das 26 ninfas do lote de verão, 11 não foram acasaladas e elaboraram apenas 32 óvulos; 15 foram acasaladas sendo que duas com dois acasalamentos e duas sem nenhuma postura. Na totalidade obtive 450 ovos e destes 228 ninfas.

Por estes dados vê-se que 8 fêmeas acasaladas (do primeiro lote criado) produziram 731 ovos dando 452 ninfas e 23 fêmeas (do segundo lote) elaboraram 715 ovos dando 350 ninfas.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. Parece existir um período anual bem definido para o surgimento dos adultos nas colônias de *P. megistus*. Esse período vai de setembro a janeiro (primavera/início de verão). Também obtive adultos nos meses de fevereiro, março, maio e agosto, mas em número bastante reduzido. O pique de saída dos adultos ocorre nos meses mais quentes. Não creio que esse fato só ocorra em condições laboratoriais, pois, as informações colhidas em Dias (1) bem como as datas de material encaminhado a esta Seção concordam com o que foi visto em laboratório.

2. Embora não seja regra, durante cada período, primeiramente surgem os machos. Pela tabela III, vemos que os meses de maior incidência de adultos são setembro e outubro e que em setembro predominam os machos, enquanto que em outubro, são as fêmeas. As últimas observações durante o período, são sempre de fêmeas.

3. A fase adulta dos machos é muito curta: em média duram de um a dois meses. Caso extremo obtido foi de 158 dias. As fêmeas têm fase de vida mais longa, entre dois a quatro meses. Caso extremo obtido foi de 458 dias.

HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia dos triatomíneos — O surgimento de adultos nas colônias de *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45:* 343-353, 1980/81.

TABELA I

Duração da fase adulta entre os machos de *P. megistus*

Intervalo de tempo	Lotes de 1973 n.º de obs.	Lotes de 1974 n.º de obs.	Lotes de 1976 n.º de obs.	Lotes de 1977 n.º de obs.
De 11 a 20 dias			1	
De 21 a 30 dias			1	2
De 31 a 40 dias		2	5	5
De 41 a 50 dias	1	7	14	6
De 51 a 60 dias	4	8	10	7
De 61 a 70 dias	6	1	4	6
De 71 a 80 dias	1	8	9	4
De 81 a 90 dias	2	4	1	3
De 91 a 100 dias	1	3	5	
De 101 a 110 dias	2	3		
De 111 a 120 dias	1	4	2	
De 121 a 130 dias	2	3	1	1
De 131 a 140 dias		3		
De 141 a 150 dias	1			
De 151 a 160 dias		1		

TABELA II

Duração da fase adulta entre as fêmeas de *P. megistus*

Intervalo de tempo	Lotes de 1973 n.º de obs.	Lotes de 1974 n.º de obs.	Lotes de 1976 n.º de obs.	Lotes de 1977 n.º de obs.
De 1 a 10 dias		2		2
De 11 a 20 dias			1	1
De 21 a 30 dias			1	
De 31 a 40 dias	1	2	1	7
De 41 a 50 dias		3	5	10
De 51 a 60 dias	1		3	5
De 61 a 70 dias		1	4	6
De 71 a 80 dias		3	4	3
De 81 a 90 dias	1	5	1	4
De 91 a 100 dias	1	3	4	1
De 101 a 110 dias	1	1	3	2
De 111 a 120 dias		1		2
De 121 a 130 dias		2		
De 131 a 140 dias	2	2		1
De 141 a 150 dias	2			1
De 151 a 160 dias	1		1	
De 181 a 190 dias	1			
De 221 a 230 dias	2			
De 231 a 240 dias		1	1	
De 241 a 250 dias			1	
De 251 a 260 dias	1			
De 271 a 280 dias		2		
De 301 a 310 dias		1	2	
De 311 a 320 dias		1		
De 321 a 330 dias	1		1	
De 341 a 350 dias		1		
De 351 a 360 dias		1		
De 361 a 370 dias	1			
De 411 a 420 dias		1		
De 451 a 460 dias		1		

HEITZMANN-FONTENELLE, T. J. Bionomia dos triatomíneos — O surgimento de adultos nas colônias de *Panstrongylus megistus* (Burm, 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45:* 343-353, 1980/81.

TABELA III

Número mensal de adultos de *Panstrongylus megistus* obtidos durante os anos de 1973 a 1981.

	ago.		set.		out.		nov.		dez.		jan.		fev.		mar.		mai.	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1973/74	1			2	5	5	3	4	3	4	3	1						
1974/75	1		3		2													
1975/76			5	2	2	1	4	3	1		1							
1976/77			17	1	5	9	2	5		3	1	2						
1977/78			7	4	1	3					1	1		1		2		
1978/79			25	1	25	28	2	2		2	1	4				1		
1979/80			9	2	9	16	1	1		1		1						
1980/81			3		11	13		3				1		2				1
1981 até novembro			21	1	5	12		6										
TOTAL	2		90	13	65	87	12	24	4	10	7	10		3		3		1

4. Em condições laboratoriais, a vida total desses barbeiros atingiu freqüentemente durações acima de mil dias (aproximadamente três anos). O máximo obtido foi de 1668 dias (quatro anos e meio) que é a idade de uma fêmea ao encerrar estas notas (30-11-1981). Essa mesma fêmea também foi responsável pela maior fase ninfal registrada no laboratório: 1638 dias.

5. Com o contínuo acasalamento de descendentes comuns, houve um esgotamento genético com redução na duração da fase adulta das fêmeas, na sua fecundidade e fertilidade. Embora tenham sido mantidas as mesmas condições ambientais como alimentação, umidade, fotoperíodo, temperaturas com pequenas oscilações e as mesmas técnicas no manuseio dos insetos, comparando apenas os dados do primeiro lote com os obtidos no lote iniciado um ano após, já notamos essa redução nitidamente. A vida das fêmeas passou de 71 a 100 dias para 31 a 60 dias. O número de ovos obtidos passou de 731 (produzido por 8 fêmeas) para 715 (produzido por 23 fêmeas). Para essas quantidades quase iguais de ovos (731 e 715) obtivemos 452 ninfas no primeiro lote e 350 ninfas no segundo.

AGRADECIMENTO

Deixo meus agradecimentos, pelas sugestões recebidas, aos Drs. José Carlos Reis de Magalhães e Lauro Travassos Filho.

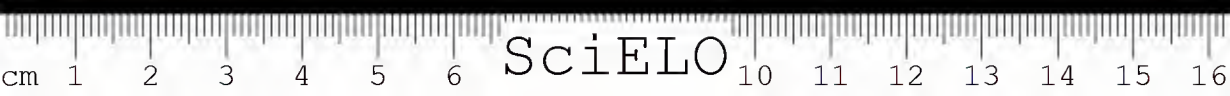
ABSTRACT: Continuous breeding, for nine years, of *P. megistus*. besides other bionomical data already published (2), disclosed two new facts: 1) Onset of adult stage was clearly seasonal (spring/summer) independently of time of nimphs eclosion and, in some cases, after nymphal stages extended for more than four years and 2) Continous inbreeding of insects showed signs of genetical depletion evidenced by retarded nymphal stages, shorter life span of adult females, reduced number of ovipositions, less eggs per oviposition and lower percentage of viable eggs.

KEYWORDS: *Panstrongylus megistus*, bionomy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DIAS, E. Variações mensais da incidência das formas evolutivas do *Triatoma infestans* e do *Panstrongylus megistus* no Município de Bambuí, Estado de Minas Gerais. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, *53*:457-472, 1955.

2. HEITZMANN-FONTENELLE, J.T. Bionomia comparativa de triatomíneos. I — *Panstrongylus megystus* (Burm., 1835) (Hemiptera, Reduviidae). *Studia ent.*, *19*:201-210, 1976.

3. NEIVA, A. *Revisão do gênero Triatoma, Lap.* Rio de Janeiro, 1914. 80p.

Mem. Inst. Butantan
44/45:355-365, 1980/81

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DOS TRIATOMINAE — HEMIPTERA, REDUVIIDAE

I — *Triatoma melanocephala Neiva & Pinto*, 1923 *

Rosa Maria de Oliveira VEIGA **
Hypolito Lima BORBA ***
Lauro Pereira TRAVASSOS FILHO **
James E. DOBBIN JR. ****

RESUMO: De *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923, é comentada toda a bibliografia, completa distribuição geográfica, incluindo a nova área, Sete Lagoas, Minas Gerais, e constatação em Pernambuco, de três exemplares positivos para formas infectantes de *Trypanosoma cruzi*, o que o torna vector potencial do agente da Moléstia de Chagas, como triatomíneo adulto encontrado em domicílios. São apresentadas fotografias coloridas do desenho original do holótipo, do exemplar de Minas Gerais e da ninfa no estádio V. Na Coleção Parasitológica do Instituto Butantan, acham-se dois exemplares de Pernambuco, n.º 988 e 989, um da Bahia, n.º 1766, e o de Minas Gerais, n.º 1841.

PALAVRAS-CHAVE: *Triatoma melanocephala* *; ninfa; vector de *Trypanosoma cruzi* *; presença em Minas Gerais *; distribuição geográfica.

INTRODUÇÃO

Iniciamos com este trabalho, uma suplementação à excelente "Monografia dos Triatomíneos", de H. Lent & P. Wigodzinsky [7], acrescentando, ao mencionado por esses autores, informes pertinentes aos exemplares da Coleção Médico-entomológica da Seção de Parasitologia do Instituto Butantan.

Versa a primeira nota sobre o *Triatoma melanocephala* porque, sendo espécie de Neiva e Pinto destacamos, como homenagem, que Arthur Neiva foi o terceiro Diretor do Instituto Butantan (7.12.1919 — 20.3.1921), antes de ter, com Cesar Pinto, descrito a espécie em tela e, à esta, podemos acrescentar outros dados interessantes, a presença do triatomíneo no Estado de Minas Gerais, o encontro de exemplares por-

---

* Trabalho apresentado no VIII Cong. Brasil. de Entomologia — Brasília — DF., 1983.
** Parasitologia, Instituto Butantan — C. Postal 65 — São Paulo.
*** Sucam — M.S. — Pernambuco.
**** Faculdade de Medicina, Universidade de Pernambuco.

tadores de formas metacíclicas nas fezes, comprovando a sua ação vectora do agente da Moléstia de Chagas e fotografia da ninfa (fig. 3).

Triatoma melanocephala Neiva & Pinto, 1923

Triatoma melanocephala Neiva & Pinto, 1923, pág. 75-6, ♀, holótipo, Bahia; Neiva & Pinto, 1923, pág. 103, n.º 17 (cit.); Pinto, 1925, pág. 59, n.º 17, fig. 39, ♀; Pinto, 1930, pág. 218-9, n.º 80; Del Ponte, 1930, pág. 885-6, n.º 20, fig. 9; Pinto, 1931, pág. 71, n.º 11, ♀, fig. 8 (pág. 62); Neiva & Lent, 1936, pág. 172, n.º 39, pág. 183, n.º 10 (cit. geog.); Neiva & Lent, 1941, pág. 80, n.º 47 (cit. geog.); Wigodzinsky, 1949, pág. 74, n.º 18 (cit.); Figueiredo, 1954, pág. 93 (cit. geog.); Lucena, 1957, pág. 543, ♀; Lucena, 1958-A, pág. 301, 313, 314, n.º 7; Lucena, 1958-B, pág. 355, 366-367, n.º 7; Lucena, 1958-C, pág. 371 (com.); Lucena, 1958-D, pág. 406, 411; Lucena, 1959, pág. 579; Dobbin Jr. & Cruz, 1966, pág. 262, 264; Corrêa, 1968, pág. 48, 59 (cits.), 63-64 (ch.); Lucena, 1970, pág. 37, 41, 69-70; Sherlock & Serafim, 1972, pág. 269, item 13, 273; Pessoa, 1974, pág. 786, item 17; Lent & Wigodzinsky, 1979, pág. 267-270, ♂ e ♀, figs. 110-112.

ANÁLISE BIBLIOGRÁFICA

Neiva & Pinto [15], 1923, descreveram *Triatoma melanocephala,* baseados em um exemplar ♀, trazido da Bahia pelo Prof. Pirajá da Silva, o holótipo da espécie, depositado nas Coleções Entomológicas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Esses informes foram novamente citados por Neiva & Pinto [16], em 1923, pág. 103, n.º 17.

Em 1925, Pinto [20], em sua tese para Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro, torna a citar o mesmo exemplar à pág. 59, n.º 17, fig. 39, figura essa, uma fotografia em branco e preto de um desenho colorido, informando ainda que, segundo Octávio Torres, "freqüenta domicílios".

Citações de *T. melanocephala,* referindo-se ao holótipo, são feitas por Pinto [21], 1930, págs. 218-9, n.º 80 e por Del Ponte [2], 1930, págs. 885-6, n.º 20, fig. 9, esta, reprodução da fotografia de Pinto, 1925.

Em 1931, na longa introdução do seu trabalho sobre "Valor do rostro e antena...", C. Pinto [22], à pág. 50, diz que Neiva & Pinto, publicariam revisão de triatomíneos "ilustrada com grande número de figuras originais e coloridas, executadas por exímios artistas nacionais", estampas certamente guardadas na Fundação do Instituto Oswaldo Cruz.

Aliás, à respeito dessas estampas, a elas se reportou Neiva em 1925, quando no "Prefácio" da tese de C. Pinto [20] "Ensaio Monographico", refere ter já "grande cópia de material para uma monografia ilustrada" a ser publicada nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, e que "boa parte das gravuras em cores se acham prontas" e que não havia tido ainda oportunidade para terminar seu trabalho.

Obviamente, com o entusiasmo de C. Pinto pelos triatomíneos, passou esse a ser o colaborador ao lado de Neiva, na monografia que não chegaram a publicar.

Fig. 1 — *T. melanocephala* — Holótipo. Figura colorida de Neiva & Pinto, 1923.
Fig 2 — *T. melanocephala* — Exemplar de Sete Lagoas, MG. ♂ — IB. n.º 1841.
Fig. 3 — *T. melanocephala* — Ninfa V, F_1 da ♀ do Mun. de São Joaquim do Monte, PE.

A foto branco/preto (fig. 39) dada por C. Pinto [20] em 1925 é justamente uma fotografia da figura colorida de *T. melanocephala* de uma daquelas "estampas coloridas", executadas realmente por notável desenhista daquela década, Luiz Kattenbach, e essa estampa, como outras desenhadas por Manoel de Castro Silva e Raymundo Onório, foram impressas na Litográfica Ipiranga, São Paulo — Rio de Janeiro.

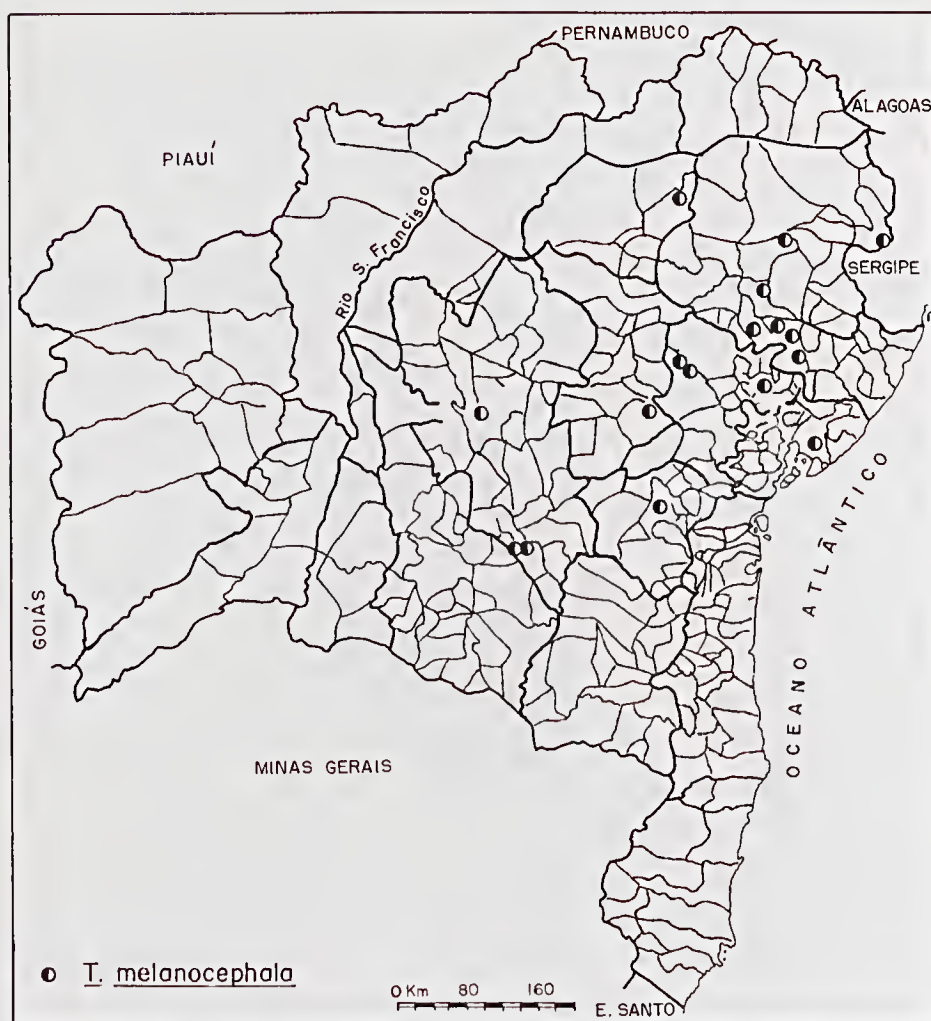



Fig. 4 — Distribuição geográfica de *T. melanocephala* no Estado da Bahia, segundo Sherlock & Serafim, 1972. Fig. 11.

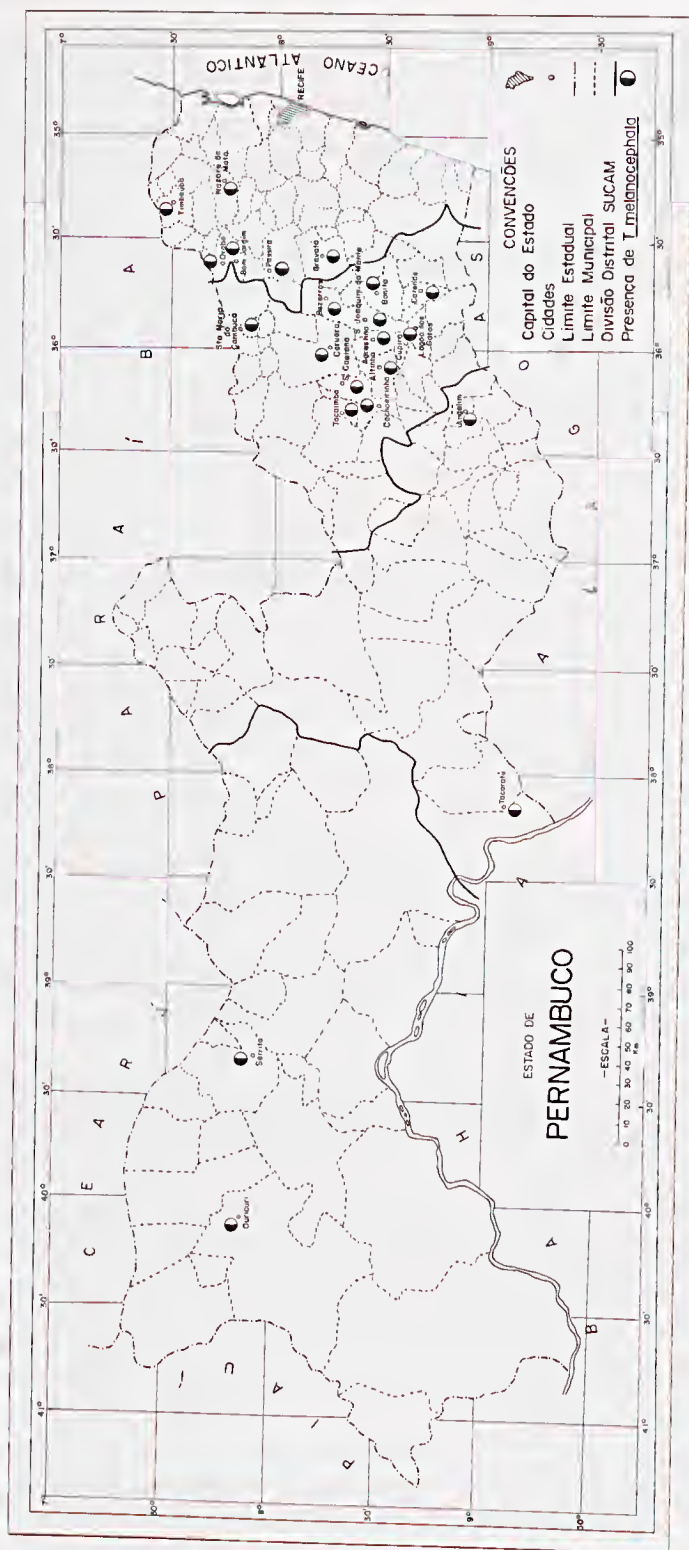



Fig. 5 — Distribuição de *T. melanocephala*, segundo Dobbin Jr. & Borba, 1982.

Damos agora, a foto colorida desse magnífico desenho, parte da estampa inédita de Neiva & Pinto, da qual um dos autores (LTF), possui uma que lhe foi dada em 1938 pelo próprio César Pinto, o qual na ocasião externou os grandes receios de Neiva e ele de não verem publicadas as estampas em tela, o que lamentavelmente se confirmou.

Nesse seu trabalho de 1931, Pinto [22] apresenta desenho da cabeça de *T. melanocephala* em perfil, para demonstrar a situação de inserção das antenas, fig. 8, pág. 62, desenho baseado no único exemplar conhecido até então, a ♀ holótipo.

Neiva & Lent [17], 1936, fazem apenas a citação geográfica muito ampla, "Brasil" e, em 1941, estes mesmos autores mencionam sem maior detalhe "Bahia e Pernambuco".

Figueirêdo [5], 1954, pág. 93, refere *T. melanocephala* em Altinho, Pernambuco.

Lucena [8], 1957, relatando a captura de 15.653 triatomíneos de hábitos domiciliares, informa ter encontrado apenas uma ♀ de *T. melanocephala*, não contaminada, no Município de Bom Jardim, localidade da região do Agreste de Pernambuco.

Lucena [9, 10], 1958-A, em trabalho que publicou duas vezes — Rev. Bras. Biol. e Rev. Bras. Malariol. D. Trop. — refere a captura de uma ♀, em Sítio Quati, no Mun. de Bom Jardim, PE, também na região do Agreste, o mesmo exemplar não contaminado, citado no seu trabalho de 1957, pág. 543.

Dessa ♀, obteve 46 ovos, cujas ninfas viveram de 1 de junho até 5 de outubro de 1955, as quais não passaram do quarto estádio, concluindo, por essa dificuldade de criação em laboratório, não ser triatomíneo de hábitos domésticos.

Lucena [9, 10], 1958-B, em sua II nota sobre Doença de Chagas em Pernambuco, mencionando o mesmo exemplar ♀ de *T. melanocephala* das notas anteriores, informa ter obtido 36 ninfas dos 46 ovos ovipostos pelo exemplar em tela.

Lucena [11], 1958-C, na III nota sobre a Doença de Chagas em Pernambuco (pág. 371), afirma que o exemplar citado anteriormente não se achava contaminado, reafirmando isso no seu trabalho de 1958-D, pág. 406 e 411.

Lucena [13], 1959, descrevendo a ecologia dos triatomíneos brasileiros, menciona *T. melanocephala* na zona do Nordeste, que "abrange todo o Nordeste Oriental, parte do Nordeste Ocidental, quase toda a Bahia e norte de Minas Gerais", ou seja, a zona das "caatingas", onde cita esta espécie como incidente e endêmica. Afirma, pág. 616, que *T. melanocephala*, além de raro, não é domiciliar, pois nas casas só foram encontradas as formas aladas.

Dobbin Jr. & Cruz [3], 1966, quando comentam os trabalhos em Triatominae de Pernambuco, verificando o controle desses insetos pelo BHC, citam o *T. melanocephala* nos Municípios de Angelim e Bom Jardim e,

assinalam-no pela primeira vez em Passira, essas três, localidades da região do Agreste, tendo encontrado a espécie também em Tacaratu, na região do Sertão.

Corrêa [1], 1968, pág. 59, afirmando que *melanocephala* não tem interesse epidemiológico, refere ser raro entre os triatomíneos assinalados na Bahia.

Lucena [14], 1970, pág. 48, conclui que as "zonas semiáridas do Agreste e Sertão são as que mais apresentaram triatomíneos", o que coincide com a maioria das capturas de *T. melanocephala*.

Sherlock & Serafim [23], 1972, indicam *T. melanocephala* como sendo de achados fortuitos, em limitadas áreas da Bahia, constando a espécie da chave para identificação de triatomíneos desse Estado (pág. 269, item 13). Indicam ser espécie de áreas com vegetação tipo Caatinga, clima dos tipos AW e BSh, em altitudes entre 100/500 m (pág. 273).

Lent & Wigodzinsky [7], 1979, descrevem minuciosamente *T. melanocephala*, com desenhos e fotografias, permitindo uma precisa caracterização de ambos os sexos da espécie.

Mencionam, sem citar o sexo, o tipo na Coleção do Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Na distribuição geográfica, indicam simplesmente "Brazil (Bahia, Paraíba, Pernambuco)", embora a legenda da fig. 110, seja mais informativa: "male, Pernambuco".

Essa referência à Paraíba deve ter sido tirada de algum exemplar de coleção estudada pelos autores, pois na bibliografia sinonímica citada, não consta esse Estado do Brasil.

SÚMULA DOS CARACTERES: Cabeça completamente preta. Tórax preto; lobo anterolateral do pronoto com pequena área amarelo-ocre externa, discreta no exemplar ♀ n.º 988-IB, área essa, visível no desenho colorido do holótipo de Neiva & Pinto, que apresentamos (fig. 1). Lobo posterior do pronoto com um par de manchas longitudinais amarelo-ocre ao longo dos lados externos das carenas medianas, manchas essas, que bem caracterizam a espécie; pernas com um par de espinhos rombos na porção proximal da face interna dos fêmures anterior e médio e que, no fêmur posterior é simples protuberância. Abdomen preto, conexivo amarelo-ocre com cinco pares de manchas pretas poligonais sobre as suturas intersegmentares e em toda a largura.

Como descrição mais minuciosa, ver Lent & Wigodzinsky, 1979, págs. 267-270, figs. 110-112.

Ninfa V Estádio: Colorido geral castanho-escuro, com áreas mais claras no dorso da cabeça, no pronoto e estojo dos élitros; uma série de pontos claros na linha dorsal e nos ângulos externos posteriores dos segmentos abdominais, conforme a fig. 3.

Lucena [9, 14], 1958-A, pág. 314 e, 1970, pág. 69-70, comenta os dados sobre a ♀ de *melanocephala* que colhera viva em 8-5-55, na região do Agreste, Sítio Quati, Município de Bom Jardim, informando que as ninfas obtidas dos 46 ovos, em 1-6-55, apenas 28 chegaram ao último estádio,

vivendo pouco mais de 4 meses, e não sendo obtidos adultos; essas ninfas viveram no estádio I, da eclosão à 1.ª ecdise, 13 dias; no estádio II, 20 dias; no estádio III, 53 dias; no IV, 38 dias; morreram no estádio V, sendo que a última morreu em 6-5-57, vivendo o considerável prazo de quase 2 anos (1-6-55 - 6-5-57). Disso concluiu Lucena, que esses triatomíneos "ainda não se encontram adaptados à habitação humana".

Dobbin Jr. & Borba [4] (informação epistolar), de uma ♀ colhida no Pov. de Monte Alegre, Mun. de S. Joaquim do Monte, no Agreste, PE, obtiveram 12 ovos, todos férteis. Das 12 ninfas eclodidas em 6-8-80, quatro morreram; três se tornaram adultas, 2 ♀♀ e 1 ♂, que viveram apenas 10 dias e tiveram um período evolutivo, de ovo a adulto, de 537 dias; cinco, ainda no estádio V, foram enviadas à Parasitologia do Inst. Butantan, de uma delas a foto apresentada (fig. 3).

Essas ninfas recebidas por via aérea, já se acham sob os cuidados da Dra. Therezinha J. Heitzmann-Fontenelle [6], para futuras anotações bionômicas, nos moldes dos trabalhos que vem publicando, sendo que uma das ninfas tornou-se adulto ♂ em 30-7-1982.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA: Bahia, Pernambuco, Paraíba, Minas Gerais (Sete Lagoas).

BAHIA: O holótipo traz apenas a indicação Bahia.

Sherlock & Serafim [23], 1972, coletaram 68 *T. melanocephala* nos Municípios de: Araci, Brejões, Conceição do Coité, Feira de Santana, Ipirá, Irará, Itaberaba, Itaquara, Ituaçu, Lamarão, Seabra, Serrinha, Simões Filho, Teofilândia, Tucano e Valente.

À essa lista, acrescentamos a localidade de Jaguarari, com exemplar ♂ coletado por "Caraibas Metais" em 26-9-1972.

Sherlock & Serafim [23], informam (pág. 273), ser *T. melanocephala* espécie de áreas, com vegetação tipo "caatinga", com clima dos tipos AW e BSh, em altitudes entre 100/500 m.

Essa distribuição é apresentada no mapa desses autores, no qual são assinaladas somente as localidades de encontro de *T. melanocephala* (fig. 4).

PERNAMBUCO: Até 1972, *T. melanocephala* foi capturado no Agreste, nos Municípios de: Bom Jardim (Povoado de Tamboatá e Sítio Quati), Altinho, Passira (Sítio Vertente Seca), Angelim; no Sertão em Tacaratu (cidade de Tacaratu).

Dobbin Jr. & Borba [4], 1972-1982 (comunicação epistolar), em levantamento triatomínico no Estado de Pernambuco, constataram *T. melanocephala* em 19 municípios; na lista apresentada são separadas as localidades pelas zonas geográficas e em cada, referidas por ordem alfabética os municípios e neles as localidades, com número de exemplares colhidos, examinados e os três exemplares positivos para *T. cruzi.*

É dado o mapa de Pernambuco onde são assinaladas as localidades citadas (fig. 5).

VEIGA, R.M.O.; BORBA, H.L.; TRAVASSOS FILHO, L.P. & DOBBIN JR., J.E. — Contribuição para o conhecimento dos Triatominae-Hemiptera, Reduviidae. I — *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:355-365, 1980/81.

DISTRIBUIÇÃO DE TRIATOMA MELANOCEPHALA EM PERNAMBUCO — 1972/1982 (DOBBIN JR. & BORBA)

MUNICÍPIO	LOCALIDADE	CAP.	EXAM.	POS.	ZONA GEOGR.	ANO
Agrestina	Faz. Riacho do Peixe	1	1	—	Agreste	1978
	St. Água Branca	1	1	—	Agreste	1982
Altinho	St. Carrão	1	—	—	Agreste	1979
	St. Jaboticaba	1	—	—	Agreste	1979
	St. Japaguaçu	1	1	—	Agreste	1982
	St. Pedra do Letreiro	1	—	—	Agreste	1979
	St. Rosilho	1	1	—	Agreste	1979
Bezerros	St. Boqueirão	1	1	—	Agreste	1981
Bom Jardim	Faz. Tamanduá	1	1	1	Agreste	1981
Bonito	St. Pau d'arco II	1	—	—	Agreste	1979
	St. Riacho Seco	2	2	—	Agreste	1975
Cachoeirinha	St. Ouricuri	1	—	—	Agreste	1979
Caruaru	Cidade	1	1	—	Agreste	1977
	Faz. Normandia	1	1	—	Agreste	1974
	St. Campos	1	1	—	Agreste	1974
Gravatá	Faz. Ladrilho	1	1	—	Agreste	1974
Lagoa dos Gatos	Eng. Burlandi	1	—	—	Agreste	1979
	St. Brejinho dos Pintos	5	5	—	Agreste	1978
	St. Gurjau	1	1	—	Agreste	1981
Orobó	St. Espinho Preto	1	1	1	Agreste	1981
S. Caetano	St. Japecanga	3	2	—	Agreste	1978
	St. Onça	1	—	—	Agreste	1978
	St. Posse	11	9	—	Agreste	1978
S. Joaquim do Monte	Faz. S. José	1	—	—	Agreste	1975
	Pov. Monte Alegre	1	1	—	Agreste	1980
Sta. Maria do Cambucá	Pov. Pau Santo	1	1	—	Agreste	1981
	St. Sete Ranchos	1	—	—	Agreste	1978
Tacaimbó	Cidade	1	—	—	Agreste	1979
Ouricuri	St. Cachoeirinha	5	—	—	Sertão	1979
Serrita	St. Mata Boi	1	1	—	Sertão	1979
Catende	St. Tapuia	1	—	—	Mata	1975
Nazaré	Cidade	2	2	1	Mata	1973
	Eng. Lagoa do Ramo de Cima	2	—	—	Mata	1972
	St. Veiga	1	—	—	Mata	1972
Timbaúba	Eng. Limoeirinho	1	1	—	Mata	1976
		58	36	3		

PARAÍBA: Sem menção de localidade.

MINAS GERAIS: Sete Lagoas (fig. 2).

EXEMPLARES DA COLEÇÃO PARASITOLÓGICA DO INSTITUTO BUTANTAN:

N.º 988 ♀ e 989 ♂, Nazaré da Mata, PE. J. Dobbin Jr. of. Agosto, 1972.

N.º 1766 ♂, Jaguarari, BA. "Caraibas Metais" of. 26-9-1972.

N.º 1841 ♂, Sete Lagoas, MG. L. Travassos Filho of. 18-4-1973.

ABSTRACT: The authors comment the bibliography of *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923 and its geographical distribution, including the new area of Sete Lagoas, State of Minas Gerais, and the first record in the State of Pernambuco of specimens positive for infected forms of *Trypanosoma cruzi* and therefore potential vectors of Chagas disease, as an adult triatomine found in houses. Color prints of the original drawings of the holotype, as well as of the specimen from Minas Gerais and of the fifth instar nymph are presented. Two specimens from Pernambuco (nr. 988, nr. 989), one from Bahia (nr. 1766) and one from Minas Gerais (nr. 1841) are deposited in the Parasitological Collection of the Institute Butantan.

KEYWORDS: *Triatoma melanocephala* *; nymph; vector of *Trypanosoma cruzi* *; recording in Minas Gerais *; geographical distribution.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CORRÊA, R.R. Informe sobre a Doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Malar.*, *20*(1-2):39-82, 1968.
2. DEL PONTE, E. Catalogo descriptivo de los géneros *Triatoma* Lap., *Rhodnius* Stal y *Eratyrus* Stal. *Rev. Inst. Bact. Malbrán.*, *5*(8):855-937, 1930.
3. DOBBIN JR., J.E. & CRUZ, A.E. Alguns informes sobre Triatomíneos de Pernambuco. *Rev. Bras. Malar.*, *18*(2):261-280, 1966.
4. DOBBIN JR., J.E. & BORBA, H.L. Comunicação epistolar, 1982.
5. FIGUEIRÊDO, A. Doença de Chagas. *An. Fac. Med. Univ. Recife*, *12*(1):81-135, 1954.
6. HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de Triatomíneos. IV. *Triatoma vitticeps* Stal, 1835 (Hemiptera, Reduviidae). *Ecossistema*, *5*:39-46, 1980.
7. LENT, H. & WIGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera--Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' Disease. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, *163*(3):123-520, 1979.
8. LUCENA, D.T. Epidemiologia da Doença de Chagas em Pernambuco. I — Distribuição geográfica dos Triatomíneos. *Rev. Bras. Malar.*, *9*(4):537-58, 1957.
9. LUCENA, D.T. Epidemiologia da Doença de Chagas em Pernambuco. II — Notas sobre as espécies de Triatomíneos. *Rev. Bras. Biol.*, *18*(3):301-15, 1958.
10. LUCENA, D.T. Epidemiologia da Doença de Chagas em Pernambuco. II — Notas sobre as espécies de Triatomíneos. *Rev. Bras. Malar.*, *10*(4):355-368, 1958.

11. LUCENA, D.T. Epidemiologia da Doença de Chagas em Pernambuco. III — Índice de infecção dos Triatomíncos. *Rev. Bras. Malar., 10*(4):369-90, 1958.

12. LUCENA, D.T. A Doença de Chagas em Pernambuco, Brasil. *Rev. Bras. Malar., 10*(4):405-16, 1958.

13. LUCENA, D.T. Ecologia dos Triatomíneos do Brasil. *Rev. Bras. Malar., 11*(4):577-635, 1959.

14. LUCENA, D.T. Estudos sobre a Doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Malar., 22*(1):3-173, 1970

15. NEIVA, A. & PINTO, C. Dos Hemipteros Hematophagos do Norte do Brazil com a descripção de duas novas espécies. Brazil-Méd., *1*(6):73-6, 1923.

16. NEIVA, A. & PINTO, C. Chave dos Reduvídeos Hematophagos brazileiros; Hábitos, Synonimia e Distribuição. Brazil-Méd., *1*(8):98-104, 1923.

17. NEIVA, A. & LENT, H. Notas e comentários sobre Triatomídeos. Lista de espécies e sua distribuição geográfica. *Rev. Ent.*, RJ, *6*(2):153-190, 1936.

18. NEIVA, A. & LENT, H. Sinopse dos Triatomídeos. Rev. Ent., RJ, *12*(1/2): 61-92, 1941.

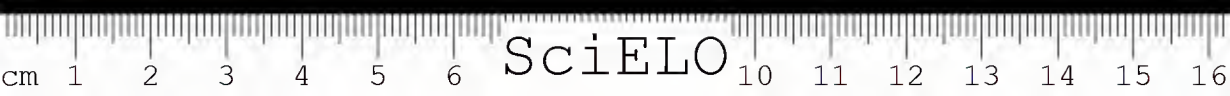
19. PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. *Parasitologia Médica.* 9.ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1974.

20. PINTO, C. Ensaio Monographico dos Reduvideos Hematophagos ou "Barbeiros". / Tese de Livre-Docência — Fac. Med. Univ. R. Janeiro. 118 págs. 1925. / (Publ. Sci. Med. RJ, III — out. nov. dez.) 1925.

21. PINTO, C. Arthropodes Parasitos e Transmissores de Doenças in T. *1. Trat. de Parasitologia.* Rio de Janeiro, 1930.

22. PINTO, C. Valor do rostro e antenas na caracterização dos gêneros de Triatomídeos. Hemiptera Reduvioidea. *Bol. Biol.* (RJ), *19*:47-136, 1931.

23. SHERLOCK, I.A. & SERAFIM, E.M. Fauna Triatominae do Estado da Bahia, Brasil. I — As espécies e distribuição geográfica. *Rev. Soc. bras. Med. trop., 6*(5):265-297, 1972.

24. WIGODZINSKY, P. Elenco Sistematico de los Reduviiformes Americanos. *Inst. Med. Reg. Univ. Nac.*, Tucuman, Argentina. Publ. 473 Mono *1*, 1949.

Mem. Inst. Butantan
44/45:367-376, 1980/81

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DAS LAGARTAS URTICANTES

I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971

(Lep. Attacidae) *

Roberto Henrique Pinto MORAES **
Lauro Pereira TRAVASSOS-FILHO **

RESUMO: É estudado o atacídeo *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971, com descrição da lagarta, bastante urticante, pupário e adultos machos e fêmeas, mencionando os caracteres pertinentes à subespécie.

São apresentados os hábitos das lagartas, épocas das diversas fases, plantas alimentícias e material da Coleção Parasitológica do Instituto Butantan. Documentação em fotografias coloridas e branco e preto, e fotos em scanning das cerdas urticantes.

PALAVRAS-CHAVE: Lepidoptera; Attacidae; *Cerodirphia avenata araguensis* *; Bionomia *; Urticante *.

INTRODUÇÃO

As larvas pilosas de mariposas (Lepidoptera-Heterocera), são conhecidas vulgarmente por "tatoranas".

O revestimento de cerdas urticantes ocorre em larvas de diversas famílias destes insetos, permitindo uma classificação sistemática relativamente fácil, quando sabe-se qual mariposa resultará de determinada lagarta, daí a importância de serem criadas em laboratório e documentados os diversos estádios de desenvolvimento, pois em muitas espécies, os primeiros estádios larvais diferem apreciavelmente dos últimos.

Também o tipo de acidente pode variar de acordo com o número e disposição das cerdas de veneno que são mais fortes e mais eficientes

---

* Trabalho apresentado no VIII Cong. Bras. de Entomologia — Brasília — DF, 1983.
** Seção de Parasitologia — Instituto Butantan. C Postal 65 — S. Paulo — Brasil.

numas, mais discretas e esparsas noutras. Nem sempre lagartas mais freqüentes causam acidentes graves, pois a presença é mais facilmente notada quando muitas, ao passo que as de hábito isolado, surpreendem os menos cautelosos nas lidas com as plantas em que se alimentam.

Nessa primeira contribuição, estudamos *Cerodirphia a.araguensis* porque suas lagartas apareceram em número apreciável no início deste ano de 1982, superando bastante as dos outros atacídeos freqüentes na região, e aproveitamos para documentar a espécie que embora em apreciável número ao nascerem de posturas de muitos ovos agrupados, ao atingirem o terceiro ou quarto estádio, apresentam uma fase de dispersão por estímulo peculiar e, abandonando a planta em que nasceram, caminham ativamente em busca de outra na qual, quando de paladar aceitável, nela permanecem até que a deixam para pupar.

Nesse período andarilho, subindo ao acaso por outras plantas, muros, portões, etc., é que ao serem tocadas acidentalmente por pessoas, determinam "queimaduras" características pela inoculação, na pele desabrigada (mãos, braços, pescoço, etc.) do veneno contido nas cerdas pontiagudas.

De acordo com Valle et al., 1971, a substância injetada é predominantemente a histamina, e por isso, nos acidentes com lagartas, é indicado o tratamento com anti-alérgicos, de preferência de uso oral.

BIONOMIA

Cerodirphia, era já lepidóptero conhecido por um dos autores (T.F.), que o considerava raro pela sua escassa presença nas muitas coletas noturnas que fez desde 1945.

Um macho, colhido em 18.12.1972 no Horto Oswaldo Cruz do Instituto Butantan, foi enviado ao Dr. Claude Lemaire, do Museu de Paris, que identificou a espécie aqui estudada, como sendo de sua autoria, *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971, exemplar esse ofertado ao identificador.

Travassos-Filho, também já havia encontrado várias lagartas não identificadas, no bairro do Ipiranga — SP, e a partir de 1970 pelas alamedas do Horto Oswaldo Cruz, tendo conseguido no decorrer dos anos, coletar larvas alimentando-se em folhas de árvores conhecidas como "canela" e, no laboratório conseguiu também que se alimentassem com folhas de "goiabeira", folhas essas em geral bem aceitas por larvas de Attacidae — Hemileucinae, tendo obtido das poucas lagartas, uma fêmea em 15.12.1975, que possibilitou a identificação da larva ao adulto já classificado.

Em 1980, ano em que foi maior o número de lagartas coletadas (cerca de 20), muitas foram capturadas em pequenos arbustos de "canela" e poucas ainda em pequenas plantas de goiabeira, confirmando a aceitação em laboratório, sem contudo obter-se adultos.

MORAES, R. H. P. & TRAVASSOS FILHO, L. P. Contribuição para o conhecimento das lagartas urticantes. I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971. (Lep. Attacidae). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:367-376, 1980/81.

Certamente, pelo processo de dispersão é que se encontra em cada arbusto alimentício uma ou outra lagarta em períodos variados de 3 a 7 dias. Essa dispersão é comprovada retirando-se as poucas larvas de um pequeno arbusto de canela, por exemplo, e passado o período mínimo de 3 dias, novas larvas de maior tamanho são encontradas na mesma planta, certamente dispersas de árvores mais altas.

Em 1981, de abril à julho, ano em que as temperaturas mais elevadas foram acima da média, conseguimos capturar cerca de 80 larvas, que alimentaram-se aparentemente bem, atingindo cerca de 8 centímetros, considerado como o máximo para larvas maduras, isto é, prontas a puparem.

Procurou-se manter umidade relativa de 80%, pois, mais úmido, aparecem os fungos rapidamente. Também procurou-se deixar um substrato de folhas secas com vistas ao meio ambiente em que foram colhidas as larvas.

Dessas 80 larvas, obtivemos apenas 7 pupas com aspecto normal e, apenas 4 adultos (3 machos e 1 fêmea) eclodidos de 14.1 a 5.2.1982.

Em fevereiro de 1982, recomeçaram a ser encontradas lagartas dessa espécie em maior número que nos anos anteriores, não só no Horto Oswaldo Cruz, como também em sítio de Embú-Guaçu, distante cerca de 40 km e Parque Primavera em Carapicuíba, 30 km distante em sentido oposto à Embú-Guaçu. Nessa mesma localidade (Embú-Guaçu) foi encontrado um lote de 214 lagartas pequenas, ainda agrupadas em poucas folhas de um mesmo arbusto. Mais tarde, naqueles locais citados, começaram a ser encontradas as lagartas isoladas ou em pequeno número (até 6 por planta) em diversas espécies vegetais, e entre essas, goiabeira e cambucí, além de canela e incenso.

Do total de lagartas coletadas em 1982 no Horto Oswaldo Cruz, Embú-Guaçu e Parque Primavera (aproximadamente 300 larvas), foram obtidas apenas 56 pupas que estão sendo observadas isoladamente, e anotadas as variações ponderais de cada uma.

CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS

As lagartas de *C. a. araguensis* são inconfundíveis com as demais lagartas de Attacidae devido ao colorido alaranjado forte das manchas sobre o tegumento preto e nos espinhos dos tufos dorsais, estes em número de 17, distribuídos por toda a extensão dorsal da larva, características que se apresentam em todos os estádios evolutivos.

As cerdas longas, anteriores, posteriores e laterais, juntamente com os respectivos espinhos das porções distais, são pretos. Os espinhos basais são amarelo-alaranjados, simulando um tufo que na realidade são espinhos que se agrupam para a base da cerda (Fig. 1).

A cápsula cefálica é amarelo-limão claro, destacando-se bem do resto do corpo, embora coberta e protegida pelas longas cerdas anteriores (Fig. 1).

MORAES, R. H. P.; & TRAVASSOS FILHO, L. P. Contribuição para o conhecimento das lagartas urticantes. I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971. (Lep. Attacidae). *Nem. Inst. Butantan*, 44/45:367-376, 1980/81.

CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DAS LAGARTAS URTICANTES I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971 (Lep. Attacidae)

Fig. 1 — *C.a. araguensis* — Lagarta madura.

Fig. 2 — *C.a. araguensis* — Extremidade cefálica de exúvia (Scanning).

MORAES, R. H. P. & TRAVASSOS FILHO, L. P. Contribuição para o conhecimento das lagartas urticantes. I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971. (Lep. Attacidae). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:367-376, 1980/81.

QUETOTAXIA

Tanto as cerdas longas e curtas com projeções espiniformes, como também os tufos de espinhos dorsais, são do tipo inoculador de veneno (figs. 3 e 4).

Os 17 tufos dorsais são distribuídos aos pares no 3.º segmento torácico e do 1.º ao 7.º segmento abdominal. No 8.º segmento abdominal apenas um tufo ímpar como mostram as figuras coloridas.

No 1.º e 2.º segmentos torácicos e 9.º segmento abdominal, os pares de tufos dorsais modificam-se: no 1.º apresentam-se como cerdas providas de espinhos em toda extensão; no 2.º e 9.º, as cerdas, apenas nas suas porções basais, apresentam espinhos pontiagudos agrupados, semelhantes aos tufos dorsais dos demais segmentos. Ainda no 9.º segmento abdominal, entre o par de cerdas, existe uma ímpar, na mesma direção do tufo de espinhos também ímpar do 8.º segmento.

Essas cerdas dorsais são as mais longas de toda a lagarta. No 1.º e 2.º segmentos torácicos são voltadas para a frente e no 9.º segmento abdominal, dispostas em sentido oposto, certamente para função tátil e também defensiva, pois, como as demais, são inoculadoras de veneno.

Ao longo de toda a lagarta, a disposição das cerdas providas de espinhos, obedece à seguinte organização: 1.º, 2.º e 3.º segmentos torácicos, com 3 cerdas de cada lado; 1.º, 2.º, 7.º e 8.º segmentos abdominais, com 3 cerdas de cada lado; 3.º, 4.º, 5.º, 6.º e 9.º segmentos abdominais, com um par de cerdas de cada lado. (Os segmentos abdominais 3.º, 4.º, 5.º e 6.º correspondem às falsas pernas).

Todas as cerdas citadas, situam-se lateralmente, entre os tufos de espinhos dorsais e a parte ventral da lagarta.

ECDISES

C. a. araguensis realiza as ecdises de crescimento de maneira peculiar; a exúvia a ser descartada rompe-se antes do estojo cefálico, que permanece preso e íntegro, sem abrir, saindo a nova cápsula cefálica como que puxada para trás (fig. 2).

A exúvia fica com aspecto de larva encolhida, mais grossa; os tufos dorsais bem unidos pelo corrugamento da pele.

Outro detalhe curioso é que essas lagartas não comem as exúvias descartadas, ficando o local com aparência de maior número de larvas simulando as exúvias, lagartas imóveis.

PUPÁRIO

As lagartas de *C. a. araguensis*, para puparem, fazem um tosco abrigo, prendendo folhas e substratos com fios de seda, fazendo uma proteção que não chega a ser casulo.

MORAES, R. H. P.; & TRAVASSOS FILHO, L. P. Contribuição para o conhecimento das lagartas urticantes. I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971. (Lep. Attacidae). *Nem. Inst. Butantan*, *44/45*:367-376, 1980/81.

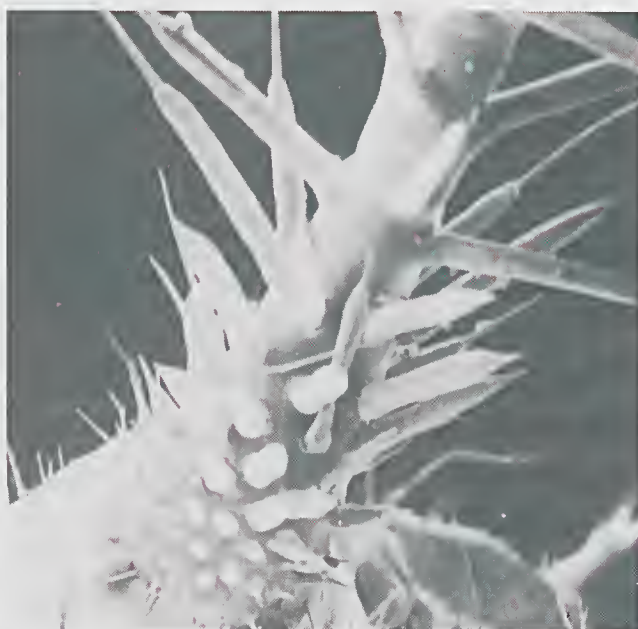



Fig. 3 — *C.a. araguensis* — Detalhe de cerda urticante (Scanning).

Fig. 4 — *C.a. araguensis* — Detalhe de tufos e cerdas urticantes (Scanning).

O pupário é bem esclerosado e preto, e o segmento terminal é característico, com formato semi-esférico, lembrando um zimbório e no centro o cremaster também característico, reto, no eixo longitudinal, apontando para trás, como mostra a foto n.º 5.

PARASITAS

Foi obtido 1 (um) exemplar de Ichneumonidae (Hymenoptera), eclodido de pupa. O material foi conservado (icneumonídeo + pupa) sob o número 2030-IB; também foi observado um lote de 30 lagartas parasitadas por *Apanteles* sp. (Braconidae).

ADULTO

Asa anterior do macho com 34 a 40,5 mm de comprimento e 21 a 26 mm na borda externa; corpo com 22 a 25 mm de comprimento, variando em função do abdômen estar ou não distendido.

Asa anterior da fêmea com 40 a 45 mm de comprimento e 20 a 25 mm na borda externa; corpo com 25 a 35 mm de comprimento, variando em função do abdômen.

Asas posteriores arredondadas, acompanhando a dimensão das anteriores.

Antena do macho com apófises em toda a extensão, as maiores na porção mediana; a da fêmea filiforme (Fig. 6).

CARACTERÍSTICAS CROMÁTICAS — Fig. 6

O colorido dorsal dos exemplares aqui estudados é predominantemente castanho-avermelhado, lembrando cor de vinho tinto, correspondendo às cores 691 (sangüíneo), 692 (bruno púrpura, bruno sangüíneo) e 696 (acaju) do Code Universal des Couleurs de Séguy, 1936 e as cores 32 (chest nut), 221B (Walnut brown) e 132A (brick red), do Naturalist Color Guide de Smithe, 1975.

A intensidade do colorido avermelhado varia pouco nos exemplares criados ou capturados quando recém-eclodidos, tendendo à cor pálida nos exemplares voados ou antigos em coleções.

Na asa anterior, uma mancha dorsal característica, alongada em alguns milímetros, mais larga sobre a nervura transversal e afinando em direção à borda da asa, sobre a segunda nervura mediana; essa mancha tem escamosidade branca e, no centro, também em desenho alongado, uma escamosidade preta com filete branco mediano, como mostram as fotos dorsais dos exemplares ♂ e ♀.

Asa posterior com colorido quase uniforme, e uma faixa escura no terço distal, acompanhando o contorno da margem externa e pequena linha branca sobre a nervura transversal.

Ainda dorsalmente, na asa posterior, a área costal tem escamosidade branca na borda, em longo e fino triângulo com base na inserção da asa, faixa limitada por escamosidade escura, separando o branco das nervuras anteriores da asa.

Fig. 5 — *C.a. araguensis* — Pupa.

Fig. 6 — *C.a. araguensis* — Vista dorsal ♂ e ♀ — ventral ♂.

Ventralmente, na área costal, a escamosidade branca é mais ampla, até a nervura subcostal e ocupa dois terços basais dessa área, se destacando bem, conferindo aspecto muito característico à espécie, conforme a foto ventral colorida. No colorido geral, a tonalidade acompanha o da asa anterior.

Os adultos voam nos primeiros e últimos meses do ano e, como vem acontecendo face ao excesso de iluminação pública, raros exemplares são encontrados em focos luminosos, apesar do grande número de larvas.

PLANTAS ALIMENTÍCIAS

"Abacateiro" — *Persea americana* Mill. Lauraceae.

"Canela-branca", Lauraceae, provavelmente do gênero *Nectandra*, aguardando-se floração dos arbustos do Horto Oswaldo Cruz, para identificação específica.

"Incenso" — *Pittosporum undulatum* Vent. Pittosporacea.

"Goiabeira" — *Psidium guajava;* "Cambuci" — *Paivaea langsdorffii* Berg, ambas Myrtacea.

MATERIAL EXAMINADO

Da coleção Entomo-Parasitológica do Instituto Butantan: Horto Oswaldo Cruz, Inst. Butantan, S. Paulo-SP: ♀, N.º 2025, 15-12-1975, pupário conservado; ♂, N.º 2026, 12-1-1979, A. R. Ali & R. H. P. Moraes col., foco luminoso; Embu-Guaçu, SP (Sítio): ♂, N.º 2028, 27-12-1981, L. Travassos Neto col., Foco luminoso; ♀, N.º 2029, 28-12-81, larva col. 18-4-1981, pupa 06.81, pupário cons.; H. O. Cruz, Inst. Butantan, São Paulo-SP; N.º 2030, nov. 1976, exúvia larval, pupário e ichneumonídeo cons.; ♂, N.º 2031, 14-1-1982, pupário cons.; ♂, N.º 2032, 15-1-1982, montagem ventral, pupário cons.; ♂, N.º 2033, 19-1-1982, pupário cons.; ♂, N.º 2034, 5-2-1982, pupário n/ cons.; ♀, N.º 2035, 18-1-1982, R. M. O. Veiga col., foco luminoso; ♀, N.º 2036, 25-1-1982, L. P. Travassos-Filho col., foco luminoso; ♂, N.º 2037, Embu-Guaçu, SP, 25-1-1982, L. P. Travassos-Filho col., foco luminoso; ♀, N.º 2038, pupa n/ eclodida, foto.

1 (um) ♂, Horto Oswaldo Cruz, I.B., SP, 18-12-1972, enviado ao Dr. C. Lemaire.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Doutores José Maria Soares Barata e Carlos José Pereira Baltar, do Depto. de Epidemiologia da Fac. de Saúde Pública da USP, pelas fotomicrografias em scanning.

Aos Drs. Olaf H. H. Mielke, da Univ. Fed. do Paraná e Gert Hatschbach, do Museu Botânico da Prefeitura de Curitiba, pela colaboração na identificação das plantas.

MORAES, R. H. P. & TRAVASSOS FILHO, L. P. Contribuição para o conhecimento das lagartas urticantes. I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971. (Lep. Attacidae). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:367-376, 1980/81.

Ao Dr. Claude Lemaire, do Museu de Paris, pela identificação da espécie.

Ao Dr. José Carlos Reis de Magalhães, pelas sugestões e leitura do original.

Às biólogas Terezinha de Jesus H. Fontenelle, Rosa Maria de Oliveira Veiga e Ana Maria Marassá, colegas da Seção, pelos incentivos, colaboração nas anotações e coleta de material.

À Sra. Domingas Moreira de Souza, servente da Seção, pela colaboração na coleta das larvas.

ABSTRACT: The authors describe the larva, which has urticating hairs, the pupa, the male and female adults of *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971 (Lepidoptera, Attacidae), and the characters of the subspecies. The habits of the larva, the period of the insect phases, the host plants, and the material from the Parasitology Collection of the Instituto Butantan are also given. Color and black and white photos of the insect and scanning photos of the urticating hairs are presented.

KEY-WORDS: Lepidoptera, Attacidae, *Cerodirphia avenata araguensis*, Bionomics, Urticating.

BIBLIOGRAFIA

CORRÊA, M.P. *Diccionario das Plantas Úteis do Brasil*. Min. Agric. Ind. Com., 1926. Vol. 1/6.

LEMAIRE, C. Description d'Attacidae (Saturn.) nouveaux d'Amerique Centrale et du Sud (Lepidop.) *Tijdschr. Ent.*, *114*(3):141-162, 12 pls., fgs., 1971.

SÉGUY, E. *Code Universal des Couleurs*. LXVIII pgs., 48 pls. (720 couleurs), Paris, 1936.

SMITHE, F.B. Naturalist Color Guide. New York, Amer. Mus., 1975. 10 pgs.+ 17 pls.

VALLE, J.R. et al. Histamine content and Pharmacological properties of crude extracts from setae of urticating caterpillars. *Arch. Intern. Pharm. & Therapie*, *98*(3):324-35, 1954.

Mem. Inst. Butantan
44/45:377-381, 1980/81

ACAROS ECTOPARASITAS DE SERPENTES. DESCRIÇÃO DE *OPHIOPTES LONGIPILIS* SP.N. E *OPHIOPTES BREVIPILIS* SP.N. (TROMBIDIFORMES, OPHIPTIDAE)

Nélida M. LIZASO *

RESUMO: Apresento o levantamento da fauna acarológica pertencente à Família Ophioptidae, ectoparasitas de serpentes não venenosas brasileiras.

Foi coletado o gênero *Ophioptes* Sambom, 1928 em serpentes procedentes de 9 Estados do Brasil.

Citam-se dados de distribuição geográfica e hospedeiros de *Ophioptes parkeri* Sambom, 1928 e descrevem-se duas espécies novas: *Ophioptes longipilis* sp.n. e *Ophioptes brevipilis* sp.n.

PALAVRAS-CHAVE: *Ophioptes* Sambom, 1928: Acarina, Ophioptidae, *Ophioptes longipilis* sp.n., *Ophioptes brevipilis* sp.n.

INTRODUÇÃO

O conhecimento da fauna acarológica pertencente à Família Ophioptidae da Região Neotropical é ainda incipiente. Foram assinalados para essa região *Ophioptes parkeri* Sambom, 1928, localidade tipo: Buenavista, Bolívia, encontrado também no Brasil, Paraguai e Argentina e *Ophioptes dromicus* Allred [1], 1958 de Cuba.

São parasitas exclusivos de serpentes em todas as fases de seu desenvolvimento.

Fain [2] em 1964 publicou um levantamento dos Ophioptidae tendo como base o material herpetológico das coleções do Musée royal de l'Afrique Centrale de Trevuren, e do Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, em Bruxelas.

Decorrente do exame sistemático — duas vezes por semana — das serpentes que chegam ao Instituto Butantan desde os mais diversos pontos do Brasil, temos agora novos dados para acrescentar tanto de distribuição geográfica e hospedeiros como também a descrição de duas novas espécies: *Ophioptes longipilis* sp.n. parasitando *Oxyrhopus trigeminus*. Duméril,

* Divisão de Biologia, Instituto Butantan — Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Técnico (CNPq). Endereço para correspondência: CEP 05504 — Caixa Postal 65, São Paulo — Brasil.

Bibron and Duméril procedente de Itu, São Paulo e *Ophioptes brevipilis* sp.n. parasitando *Chironius flavolineatus* (Boettger) procedente de Goiânia, Goiás.

MATERIAL E MÉTODO

O material estudado provém em sua maior parte do Estado de São Paulo, embora tenha sido coletado também nos Estados do Pará, Pernambuco, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul.

As serpentes chegam vivas ao Instituto Butantan e assim são examinadas. No período compreendido entre março de 1976 e fevereiro de 1982 foi examinado um total de 3.006 serpentes, das quais 511 se apresentavam com ectoparasitas. Destas, 49 exemplares apresentavam *Ophioptes*.

As serpentes parasitadas por *Ophioptes* pertencem a 11 gêneros da subfamília Colubrinae. Este material herpetológico foi identificado pelo pessoal da Seção de Herpetologia do Instituto Butantan.

Todas as serpentes foram examinadas vivas, aquelas que se apresentavam parasitadas foram anestesiadas com éter sulfúrico e em seguida os parasitas removidos com escarificador, um a um, geralmente a observação com estereomicroscópio.

Os parasitas foram coletados todos na fase adulta, alguns dentro das crateras escavadas nas escamas, mas a maioria deles caminhando lentamente sobre as escamas.

Ophioptes longipilis sp.n.
(Figs. 1-3)

Fêmea: comprimento do idiossoma 318μ, largura 360μ.

Face dorsal: pêlos escapulares medindo 31μ, dorsais anteriores, 36μ e dorsais posteriores 9μ. Face ventral: placa genitoventral medindo 23μ de comprimento e 38μ de largura; os quatro pares de pêlos genitoventrais implantam-se fora da placa (fig. 1).

Gnatossoma: com dois pêlos, um laterobasal fino, medindo 15μ e outro ventrobasal com 16μ. Palpo tarsal com 1 pêlo anterior medindo 24μ e comprimento; espinhos das tíbias medindo: I 22μ, II 28μ, III 34μ, IV 33μ. 1 posterior com 11μ (fig. 2).

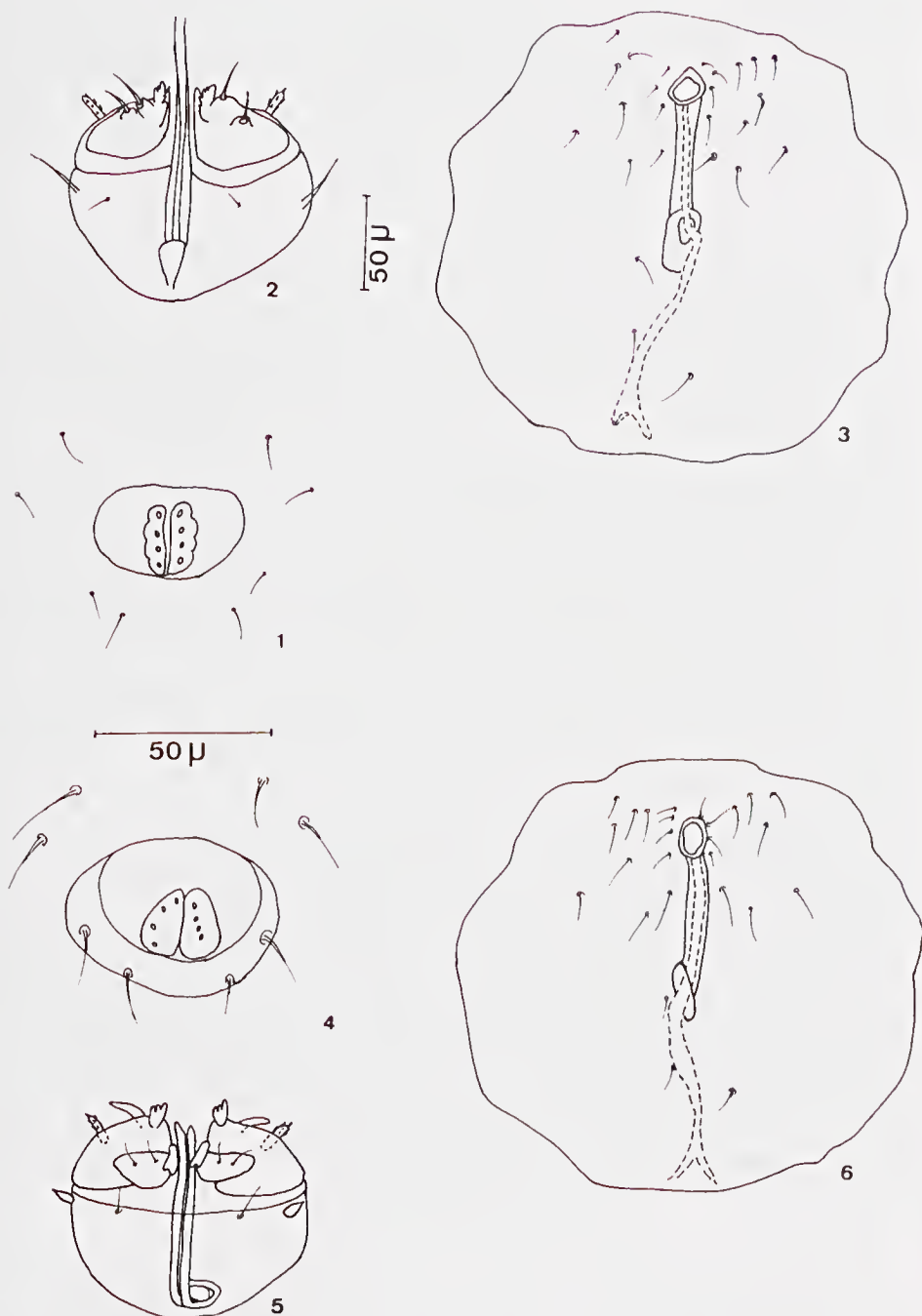
Pernas: trocanter IV com 1 pêlo fino e farpado, de 56μ de comprimento: fêmur I com 1 pêlo liso e 1 rombudo e farpado de 75μ de comprimento; espinhos das tíbias medindo: I 22μ, II 28μ, III 34μ, IV 33μ. Pulvilhos dos tarsos: bárbulas em n.º de 8 apicais e 10 basais.

Macho (fig. 3): comprimento do idossoma 240μ, largura 234μ.

Face dorsal: pêlos escapulares curtos e fortes medindo 13μ, pêlos dorsais anteriores de 36μ, dorsais posteriores de 8μ e genitais de 9μ. Face ventral: pêlos ventrais posteriores finos de 8μ de comprimento.

Gnatossoma: pelo laterobasal medindo 13μ, ventrobasal de 9μ, tarsal anterior de 19μ, tarsal posterior de 9μ.

Holótipo fêmea, Brasil, São Paulo, Itu, em *Oxyrhopus trigeminus* Duméril, Bibon and Duméril, 7-II-77, N. M. Lizaso col., lote n.º 6070.

LIZASO, N. M. Ácaros ectoparasitas de serpentes. Descrição de *Ophioptes longipilis* sp.n. e *Ophioptes brevipilis* sp.n (Trombidiformes, Ophioptidae). *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:377-381, 1980/81.

Prancha 1 — *Ophioptes longipilis* sp.n. Fig. 1: fêmea, placa genitoventral; Fig. 2: gnatossoma; Fig. 3: macho, idiossoma. c

Ophioptes brevipilis sp.n. Fig. 4: fêmea, placa genitoventral; Fig. 5: gnatossoma; Fig. 6: macho, idiossoma. c

LIZASO, N. M. Ácaros ectoparasitas de serpentes. Descrição de *Ophioptes longipilis* sp.n. e *Ophioptes brevipilis* sp.n (Trombidiformes, Ophioptidae). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:377-381, 1980/81.

Parátipos: os mesmos dados do holótipo: 3♀ e 1♂; Pernambuco, Guararapes, em *Oxyrhopus trigeminus*, 14-IV-78, N. M. Lizaso col., 1♀; Goiás, Itumbiara, em *Oxyrhopus trigeminus*, 23-X-79, N. M. Lizaso col., 2♂; Espírito Santo, Domingos Martins, em *Leimadophis poecilogyrus* (Wied), 10-VII-78, N. M. Lizaso col., 5♀ e 2♂; São Paulo, Itú, em *Oxyrhopus trigeminus*, 25-IX-78, N. M. Lizaso col., 3♀ e 2♂; Paraná, Foz do Areia, em *Oxyrhopus petola* (Linneaus), 25-IV-80, N. M. Lizaso col., 2♀.

Ophioptes brevipilis sp.n.
(Figs. 4-6)

Fêmea: comprimento do idiossoma 342μ, largura 360μ.

Comprimento dos pêlos da face dorsal: escapulares: 15μ, dorsais anteriores: 34μ, dorsais posteriores: 21μ.

Face ventral: placa genitoventral de aspecto irregular medindo 49μ de comprimento por 50μ de largura onde se implantam 2 pares de pelos posteriores (fig. 4).

Gnatossoma (fig. 5): apresenta 1 espinho laterobasal de 8μ de comprimento e 1 pelo ventrobasal medindo 15μ; o palpo tarsal apresenta 1 pêlo anterior medindo 15μ e 1 posterior com 10μ.

Pernas: o trocanter III com 1 pêlo dorsal rombudo e farpado de 64μ e o IV com 1 pêlo rombudo e farpado de 64μ de comprimento; fêmur I com um pêlo dorsal rombudo e farpado de 60μ; espinhos das tíbias medindo: I 17μ, II 20μ, III 24μ, IV 24μ respectivamente. Pulvilhos dos tarsos: bárbulas em n.º de 9 apicais e 8 basais.

Macho (fig. 6): comprimento do idiossoma 222μ, largura 240μ.

Face dorsal: pêlos escapulares de 13μ, dorsais anteriores de 43μ, dorsais posteriores de 8μ e genitais de 13μ. Face ventral: pêlos ventrais posteriores finos de 12μ.

Gnatossoma: 1 pêlo laterobasal medindo 13μ, ventrobasal, 13μ, tarsal anterior forte de 19μ, tarsal posterior fino de 8μ.

Holótipo fêmea, Brasil, Goiás, Goiânia, em *Chironius flavolineatus* (Boettger), 30-III-79, N. M. Lizaso col., lote n.º 6327.

Parátipos: os mesmos dados do holótipo: 5♀; Itumbiara, em *Philodryas olfersii* (Lichtenstein), 16-XI-79, N. M. Lizaso col., 5 ♀ e 3 ♂; Mato Grosso, Três Lagoas, em *Mastigodryas bifossatus* (Raddi), 29-XII-78, N. M. Lizaso col., 3♀ e 1 ♂; Espírito Santo, Colatina, em *Leimadophis poecilogyrus* (Wied), 17-II-78, N. M. Lizaso col., 1♀ e 4♂; São Paulo, Tupã, em *Mastigodryas bifossatus*, 1-XII-78, N. M. Lizaso col., 9♀ e 4♂; Rosana, em *Lygophis meridionalis* (Schenkel), 12-I-79, N. M. Lizaso col., 3♀ e 2♂; Paraná, Uraí, em *Philodryas olfersii*, 11-IX-79, N. M. Lizaso col., 1♀.

DISCUSSÃO TAXONÔMICA

Estas duas espécies apresentam aspecto geral bastante semelhante. Os exemplares fêmeas se diferenciam: *Ophioptes brevipilis* sp.n. apresenta gnatossoma com 1 pêlo laterobasal curto e forte, em forma de espinho; *Ophioptes longipilis* sp.n. apresenta este pêlo longo e fino. A placa genitoventral, em *brevipilis* é de aspecto irregular e nela se implantam

dois pares de pêlos posteriores; em *longipilis* é pequena de aspecto regular e sem pêlos.

De modo geral *longipilis* apresenta pêlos e espinhos de maior tamanho que *brevipilis*, detalhe este notório nos espinhos das tíbias.

Ophioptes parkeri Sambom, 1928

É a espécie mais abundante no material coletado e que abrange maior distribuição geográfica e variedade de hospedeiros.

Damos a seguir esta relação de hospedeiros e localidades: Pará, Belém, em *Spilotes pullatus* (Linneaus), 30-III-79, N. M. Lizaso col., 3 ♀ ; Goiás, Itumbiara, em *Leimadophis poccilogyrus* (Wied), 23-X-79, N. M. Lizaso col., 35 ♀ e 28 ♂ ; em *Waglerophis merremii* (Wied), 23-X-79, N. M. Lizaso col., 1 ♀ ; em *Lygophis meridionalis* (Schenkel), 23-X-79, 18 ♀ e 3 ♂ ; Minas Gerais, Uberlândia, em *Waglerophis merremii*, 5-XI-76, 2 ♀ ; em *Leimadophis poecilogyrus*, 18-XI-77, N. M. Lizaso col., 1 ♀ ; Juiz de Fora, em *Leimadophis poecilogyrus*, 4-III-77, N. M. Lizaso col., 10 ♀ ; Lambari, em *Erythrolamprus aesculapii* (Linneaus), 22-IX-78, N. M. Lizaso col., 12 ♀ e 27 ♂ ; Sapucaí, em *Spilotes pullatus* (Linneaus), 22-XII-78, N. M. Lizaso col., 35 ♀ e 19 ♂ ; Três Corações, em *Erythrolamprus aesculapii*, 19-V-81, N. M. Lizaso col., 6 ♀ ; Espírito Santo, Colatina, em *Leptodeira annulata* (Linneaus), 17-II-78, N. M. Lizaso col., 2 ♀ e 2 ♂ ; São Paulo, Presidente Wenceslau, em *Leimadophis poecilogyrus*, 14-IV-76, N. M. Lizaso col., 5 ♀ e 2 ♂ ; Arujá, em *Chironius foveatus* Bailey, 22-XI-76, N. M. Lizaso col., 5 ♀ e 2 ♂ ; Biritiba Mirim, em *Erythrolamprus aesculapii*, 20-II-78, N. M. Lizaso col., 18 ♀ e 9 ♂ ; Araçoiaba da Serra, em *Chironius foveatus*, 27-II-78, N. M. Lizaso col., 2 ♀ ; Rancharia, em *Erythrolamprus aesculapii*, 22-V-78, N. M. Lizaso col., 7 ♀ e 2 ♂ ; Inúbia Paulista, em *Erythrolamprus aesculapii*, 22-IX-78, N. M. Lizaso col., 47 ♀ e 19 ♂ ; Jaú, em *Waglerophis merremii* (Wied), 26-XII-78, N. M. Lizaso col., 1 ♀ ; Morro Agudo, em *Erythrolamprus aesculapii*, 7-XII-81, N. M. Lizaso col., 5 ♀ e 2 ♂ ; São Carlos, em *Waglerophis merremii*, 7-XII-81, N. M. Lizaso col., 1 ♀ ; em *Erythrolamprus aesculapii*, 7-XII-81, N. M. Lizaso col., 1 ♀ ; Rio Grande do Sul, Pelotas, em *Leimadophis poecilogyrus*, 1-XI-76, N. M. Lizaso col., 5 ♀ e 1 ♂ .

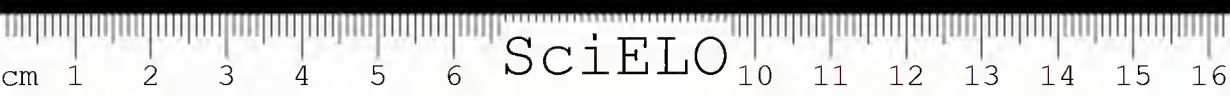
ABSTRACT: This paper presents a study of the ectoparasite mites from non poisonous brazilian snakes of the family Ophioptidae. The genus *Ophioptes* Sambom, 1928 was collected in snakes from 9 states of Brazil.

The geografical distribution and hosts of *Ophioptes parkeri* Sambom are given and two new species are described: *Ophioptes* longipilis sp.n. and *Ophioptes brevipilis* sp.n.

KEY-WORDS: *Ophioptes* Sambom, 1928; Acarina, Ophioptidae, *Ophioptes longipilis* sp.n., *Ophioptes brevipilis* sp.n.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLRED, D.M. A new species of pit mite (Acarina, Ophioptidae) infesting snakes. *Herpetológica, 14*:107-112, 1958.

2. FAIN, A. Les Ophioptidae acariens parasites des ecailles des serpentes (Trombidiformes). *Bull. Inst. roy. Sci. nat. Belg., 40*(15):1-57, 1964.

Mem. Inst. Butantan
44/45:383-390, 1980/81

GYRINICOLA CHABAUDI N.SP. (NEMATODA, PHARYNGODONIDAE), OXIURÍDEO ENCONTRADO EM GIRINOS *

Paulo ARAUJO **
Paulo de Toledo ARTIGAS **

RESUMO: O gênero *Gyrinicola* contém, até o presente, três espécies encontradas em larvas de anuros: *G. batrachiensis* que ocorre nas regiões oriental e central da América do Norte; *G. tba*, na Checoslováquia, no Cáucaso e no delta do Danúbio europeu; *G. japonica*, no Japão. No presente trabalho é descrita uma espécie nova, a quarta do gênero, *Gyrinicola chabaudi*, encontrada em girinos de *Leptodactylus ocellatus*, no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: *Gyrinicola chabaudi* n.sp.; Nematoda; Pharyngodonidae; girinos; anuros.

INTRODUÇÃO

Espécimens de oxiurídeos foram colhidos do intestino de girinos de *Leptodactylus ocellatus* oriundos do município de Santo Amaro, Estado de São Paulo. Apesar de não terem sido encontrados exemplares machos, as características morfológicas das fêmeas permitiram-nos incluí-los no gênero *Gyrinicola* Yamaguti, 1938.

Yamaguti [10] (1938), para abrigar o gênero *Gyrinicola*, criou a família Gyrinicolidae, colocando-a na superfamília Oxyuroidea e, posteriormente [11] (1961), na ordem Oxyuridea. Chabaud [3] (1978), transformou Gyrinicolidae em subfamília, situando-a na família Cosmocercidae (Cosmocercoidea). Recentemente, Adamson [1] (1981) transferiu o gênero *Gyrinicola* para a família Pharyngodonidae (Oxyuroidea) *sensu* Petter e Quentin [6] (1976).

O gênero *Gyrinicola*, segundo Adamson [1], possui, atualmente, três espécies encontradas em girinos: *G. batrachiensis* (Walton, 1929) Adamson, 1981, *G. tba* (Dinnik, 1930) Adamson, 1981 e *G. japonica* Yamaguti, 1938, distintas apenas pela distribuição geográfica.

---

* Trabalho apresentado no VII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia. Porto Alegre (RG), de 31 de janeiro a 4 de fevereiro de 1982.

** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, P. & ARTIGAS, P. T. *Gyrinicola chabaudi* n.sp. (Nematoda, Pharyngodonidae), oxiurídeo encontrado em girinos. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:383-390, 1980/81.

Como os oxiurídeos por nós encontrados apresentavam caracteres morfológicos que os distanciavam das demais espécies do gênero *Gyrinicola,* parece-nos que os mesmos devam constituir uma nova espécie, para a qual propomos o nome *Gyrinicola chabaudi* n.sp.

DESCRIÇÃO

Gyrinicola chabaudi n.sp. — Pharyngodonidae.

Fêmeas "grávidas" — Vermes pequenos, afilados nas extremidades, desprovidos de asas laterais. Abertura bucal hexagonal limitada por lábios indistintos, circundada por 4 papilas e 2 ânfides pedunculadas (fig. 1, 2). Esôfago constituído de corpo ligeiramente dilatado posteriormente, de istmo curto e de bulbo esferóide valvulado. Poro excretor pós-bulbar. Cauda inicialmente com forma de tronco de cone, continuando-se por um processo delgado, quatro a cinco vezes mais longo que a parte inicial; fásmides situadas no limite dessas duas porções da cauda. Vulva com borda anterior saliente, situada um pouco adiante do meio do corpo do verme. O ovijetor, dirigindo-se inicialmente para a extremidade anterior, toma, após curvatura, direção oposta. Depois de ultrapassar posteriormente o nível da vulva, apresenta uma dilatação, continuando-se, a seguir, pelo útero repleto de ovos de casca espessa. Após curto trajeto em direção da extremidade posterior, dirige-se o útero para a frente, enovela-se e continua-se pelo ovário que, após curvaturas sinuosas, torna-se retilíneo, dirigindo-se em direção da cauda do verme e apresentando sua extremidade livre um pouco adiante do ânus (fig. 3).

Em alguns dos exemplares examinados foi observada a ocorrência de pequeno "apêndice digitiforme", de comprimento variável, situado na face esquerda do ovijetor, próximo do início do útero acima descrito. Tal apêndice, dirigindo-se anteriormente, não atinge o nível da vulva. Em seu interior não foi observada a presença de ovos.

Os ovos são alongados (dimensões — em micrômetros — de 20 ovos: 102-118 x 48-56, média 112 x 51), assimétricos, com casca espessa, operculados e de aspecto triangular quando vistos em secção transversal (fig. 4). Os opérculos, de situação subpolar, apresentam-se com forma de elípse (fig. 5). Dois opérculos, vistos perpendicularmente, mediram (em micrômetros) 28 e 30 de comprimento por 16 e 15 de largura. De 4 ovos examinados, com 102, 103, 105 e 110 micrômetros de comprimento, foi observado que seus opérculos mediam 29, 29, 28 e 30 micrômetros de comprimento, representando estas medidas, respectivamente, os percentuais de 28,4, 28,1, 26,6 e 27,2 do comprimento dos ovos.

Na tabela 1, encontram-se as dimensões principais obtidas de 20 fêmeas "grávidas" de *G. chabaudi.*

Espécimen tipo — O holótipo, desprovido do "apêndice digitiforme uterino" acima mencionado, apresentou as seguintes dimensões (em micrômetros): comprimento 2794; largura ao nível da junção esôfago-intestino 178 e ao nível da vulva 170; comprimento total do esôfago 518; comprimento do corpo esofagiano 421; largura do bulbo esofagiano

ARAÚJO, P. & ARTIGAS, P. T. *Gyrinicola chabaudi* n.sp. (Nematoda, Pharyngodonidae), oxiurídeo encontrado em girinos. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:383-390, 1980/81.

TABELA 1

Principais dimensões (em micrômetros, a menos que haja indicação) de 20 fêmeas "grávidas" de *Gyrinicola chabaudi* n.sp. colhidas de girinos de *Leptodactylus ocellatus*.

	Mín. — Máx.	Média	
Comprimento (mm)	2,146 — 3,312	2,745	
Largura[a]	145 — 210	168	
Largura[b]	129 — 218	162	
Esôfago: comprimento total	421 — 558	494	(17,9)
Esôfago: corpo, comprimento	332 — 445	400	(14,5)
Esôfago: bulbo, largura	56 — 113	103	
Anel nervoso[c]	129 — 170	149	(5,4)
Poro excretor[c]	542 — 868	675	(24,5)
Vulva (mm)[c]	0,931 — 1,494	1,220	(44,4)
Ovário-anus[d]	16 — 283	123	(4,4)
Cauda	486 — 648	533	(19,4)

a — Ao nível da junção esôfago-intestino.
b — Ao nível da vulva.
c — Distância da extremidade anterior.
d — Distância da extremidade livre do ovário ao anus.

Os números entre parênteses representam as porcentagens relativas ao comprimento do corpo do verme.

113; distância da extremidade anterior ao anel nervoso 145 e ao poro excretor 631; distância da vulva à extremidade anterior 1158; distância da extremidade livre do ovário ao ânus 194; comprimento da cauda 583.

Fêmeas imaturas — Em fêmeas imaturas, com útero desprovido de ovos, o aparelho genital era mais facilmente observável que em fêmeas "grávidas". Os aparelhos genitais de duas fêmeas, uma com 1,544 mm e outra com 1,8 mm de comprimento, estão representados nas figuras 6 e 7, respectivamente. No aparelho genital da fêmea com 1,544 mm de comprimento (fig. 6), observa-se o ovijetor que, após pequeno trajeto em direção anterior, encurva-se, tomando direção oposta, apresentando a seguir, grande dilatação, da qual sai o tubo útero-ovariano. Este, inicialmente dirige-se para a frente e após curvatura segue, com forma retilínea, em direção da cauda. O aparelho genital da fêmea com 1,8 mm de comprimento (fig. 7), semelhante ao da fêmea com 1,544 mm de comprimento, apresenta, na face esquerda da parte dilatada do ovijetor, pequeno "apêndice digitiforme" dirigido em direção da extremidade anterior do verme.

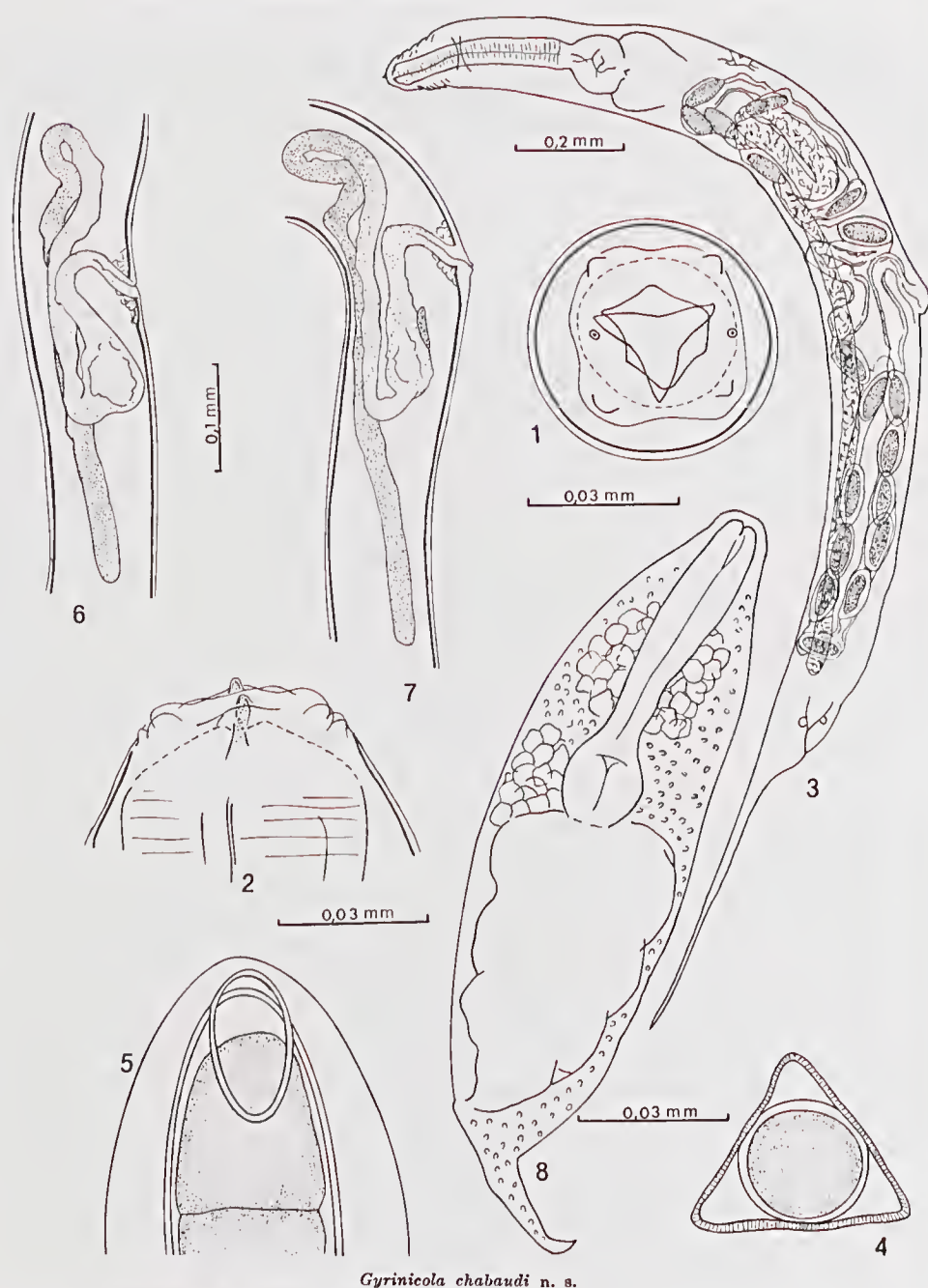
Larvas artificialmente eclodidas — Fêmeas recém-colhidas de girinos e postas em salina, realizaram oviposição. Em ovos assim obtidos e incubados à temperatura de 25°C observou-se que, aos 4 dias de incubação, as larvas desenvolvidas, ocupando todo o espaço interno da casca do ovo, apresentavam movimentos periódicos de rotação em torno do eixo longitudinal. Nessas larvas era observável o esôfago com seu aparelho

Gyrinicola chabaudi n. s.

Fig. 1 — Extremidade anterior, vista apical.
Fig. 2 — Extremidade anterior, vista lateral.
Fig. 3 — Fêmea "grávida".
Fig. 4 — Seção transversal de ovo.
Fig. 5 — Opérculo de ovo.
Fig. 6 — Aparelho genital de fêmea imatura, desprovido de "apêndice digitiforme".
Fig. 7 — Aparelho genital de fêmea imatura, com "apêndice digitiforme" na face esquerda do ovijetor.
Fig. 8 — Larva eclodida artificialmente após 8 dias de incubação à temperatura de 25°C.

valvular. Aos 8 dias de incubação, verificou-se que as larvas permaneciam aparentemente imóveis. A eclosão artificial de larvas foi provocada por ligeira compressão exercida sobre ovos entre lâmina e lamínula em meio constituído de salina. De duas larvas artificialmente eclodidas aos 8 dias de incubação foram obtidas as seguintes dimensões (em micrômetros): comprimento do corpo 156 e 173; largura máxima (ao nível da junção esôfago-intestino) 39 e 38; comprimento total do esôfago 64 e 80 (41,0 e 46,2% do comprimento da larva); cauda 33 e 34 (21,1 e 19,6%).

Na larva com 156 micrômetros de comprimento (fig. 8) foram observados, além do esôfago e do intestino nitidamente delimitados, dois agrupamentos de grandes células, um ao redor da metade posterior do corpo esofagiano e outro, na região ventral da larva, ao nível do bulbo esofagiano; provavelmente esses agrupamentos celulares representam os primórdios do anel nervoso e do aparelho excretor.

Espécimens tipo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Holótipo MZUSP n.º 5730. Parátipos MZUSP n.º 5731.

Hospedeiro: Larva (girino) de *Leptodactylus ocellatus.*

Localização no hospedeiro: Intestino.

Localidade: Jardim Novo Horizonte, município de Santo Amaro, SP.

DISCUSSÃO

Walton [8], em 1929, criou a espécie *Pharyngodon batrachiensis,* de girinos de *Rana pipiens* e, em 1933 [9], *P. armatus,* de *R. pipiens* e de *R. clamitans,* da América do Norte. Em ambas as espécies o poro excretor estava situado ao nível do bulbo esofagiano.

Holoman [5] (1969), examinando espécimen tipo de *P. armatus,* constatou algumas discrepâncias na descrição original de Walton [9], entre elas, a situação do poro excretor que era pós-bulbar e não ao nível do bulbo esofagiano, como descrevera Walton [9]. Holoman [5], em material colhido de girinos de *R. clamitans melanota,* encontrou, pela primeira vez, machos de *P. armatus.* Descreveu-os e redescreveu as fêmeas. Com relação ao opérculo dos ovos de *P. armatus,* Holoman [5] representa-o em figura, de forma nitidamente circular.

Adamson [1], após estudo de espécimens de *P. batrachiensis* e de *P. armatus* depositados em coleções helmintológicas por Walton [8, 9] e por Holoman [5], transferiu *P. batrachiensis* para o gênero *Gyrinicola* e colocou *P. armatus* na sinonímia de *G. batrachiensis.* Ainda Adamson [1], examinando exemplares de *G. batrachiensis* por ele colhidos de girinos de *R. clamitans, R. catesbeiana, R. pipiens, R. sylvatica, Hyla versicolor* e *Bufo americanus,* constatou a não ocorrência de exemplares machos no material encontrado em girinos de *R. sylvatica* e de *B. americanus.* Nas fêmeas encontradas nos hospedeiros nos quais ocorriam machos, verificou que as mesmas possuíam dois úteros, um de situação ventral, contendo ovos de casca delgada em vários estádios de desenvolvimento, e outro,

dorsal, com ovos de casca espessa e operculados, em estádio inicial de divisão celular. Estes ovos, de casca espessa, apresentavam-se com forma triangular em secção transversal. Em fêmeas colhidas de hospedeiros nos quais não foram encontrados espécimens machos (girinos de *R. sylvatica* e de *B. americanus*), constatou que as mesmas possuíam somente um útero, dorsal, no qual havia apenas ovos de casca espessa e operculados. Com relação ao opérculo dos ovos de casca espessa, Adamson [1], em sua redescrição de *G. batrachiensis*, afirmou ser o mesmo de situação subpolar e de forma circular. Finalmente, conclui Adamson [1] que existem, até o presente, três espécies conhecidas do gênero *Gyrinicola* distintas apenas pela sua distribuição geográfica: *G. batrachiensis* que ocorre nas regiões oriental e central da América do Norte; *G. tba*, na Checoslováquia, no Cáucaso e no delta do Danúbio europeu; *G. japonica*, encontrada no Japão.

Considerando-se os dados relativos ao comprimento do corpo, às dimensões e às posições de vários órgãos obtidos por Adamson [1] de exemplares de *G. batrachiensis* colhidos de girinos de *R. sylvatica* e de *B. americanus*, verifica-se que, por esses dados, não seria possível diferenciar *G. chabaudi* de *G. batrachiensis*. Contudo, a forma do opérculo dos ovos, circular em *G. batrachiensis* segundo Holoman [5] e Adamson [1], de elípse em *G. chabaudi;* o comprimento do eixo longitudinal do opérculo dos ovos, menor nos de *G. batrachiensis* (15,2 e 15,4% do comprimento de ovos figurados, respectivamente, por Holoman [5] e por Adamson [1]) que nos de *G. chabaudi* (26,6 a 28,4% do comprimento de 4 ovos examinados), constituem, a nosso ver, caracteres específicos que permitem a diferenciação dessas duas espécies.

Além disso, em ovos oriundos de exemplares de *G. batrachiensis* colhidos de *R. clamitans*, Adamson [2] (1981) observou desenvolvimento máximo de larvas aos 6 dias de incubação à temperatura de 20°C. De três larvas eclodidas artificialmente por meio de compressão de ovos entre lâmina e lamínula, obteve Adamson [2] as seguintes dimensões principais (em micrômetros): comprimento do corpo 232 a 238, largura máxima 34 a 37, comprimento do esôfago 91 a 104 e comprimento da cauda 62 a 66. Comparados esses dados com os obtidos por nós de duas larvas de *G. chabaudi* eclodidas artificialmente após 8 dias de incubação a 25°C, verificou-se que as larvas de *G. chabaudi* eram mais curtas e mais largas que as larvas de *G. batrachiensis* examinadas por Adamson [2]. Também, relacionados o comprimento do esôfago e o da cauda com o comprimento da larva, constatou-se que em larvas de *G. chabaudi* o esôfago era mais longo e a cauda era mais curta que em larvas de *G. batrachiensis*. Tais diferenças constatadas em larvas, contribuem para distinguir *G. chabaudi* de *G. batrachiensis*.

G. chabaudi difere de *G. Tba* pela ocorrência de um útero (dois úteros em *G. tba*, segundo Dinnik [4], 1930 e Volgar [7], 1959); pelo comprimento do eixo longitudinal do opérculo dos ovos, maior em *G. chabaudi* (26,6 a 28,4% do comprimento de 4 ovos examinados) que em *G. tba* (cerca de 15% do comprimento de ovo figurado por Dinnik [4]); pela distribuição geográfica, *G. chabaudi* encontrada na América do Sul — Brasil —, *G. tba*, no Velho Mundo — Checoslováquia, Cáucaso e delta do Danúbio.

G. chabaudi distingue-se de *G. japonica* pelos seguintes caracteres: ocorrência de apenas um útero (dois úteros em *G. japonica*); cauda mais longa, representando, em média, 19,4% do comprimento do verme (cerca de 10% em *G. japonica*); vulva pré-equatorial (pós-equatorial em *G. japonica*); ovos mais longos que os de *G. japonica* (ovos de *G. chabaudi* 102-118 x 48-56 micrômetros, de *G. japonica* 87-96 x 48-54 micrômetros); pela distribuição geográfica, *G. chabaudi* assinalada na América do Sul — Brasil —, *G. japonica*, no Oriente — Japão. Quanto à forma do opérculo, não podemos compará-la visto que Yamaguti [10], na descrição de sua espécie, não mencionou a ocorrência de opérculo nos ovos, provavelmente por não o ter observado.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Sr. W. C. A. Bokermann, da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, pela identificação dos girinos utilizados no presente trabalho.

ABSTRACT: The genus *Gyrinicola* contains three species described from tadpoles: *G. batrachiensis* occurs in eastern and central North America; *G. tba*, in Czechoslavakia, the Caucasus and the Danube delta in Europe; *G. japonica*, in Japan. In this paper a new species is described, the forth of the genus, and is named *Gyrinicola ehabaudi*, after specimens collected from tadpoles of *Leptodactylus ocellatus*, in Brazil.

KEYWORDS: *Gyrinicola ehabaudi* n.sp.; Nematoda; Pharyngodonidae; tadpole; anurans.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMSON, M.L. *Gyrinieola batrachiensis* (Walton, 1929) n. comb. (Oxyuroidea: Nematoda) from tadpoles in eastern and central Canada. *Canad. J. Zool., 59*:1344-1350, 1981.
2. ——— Development and transmission of *Gyrinicola batrachiensis* (Walton, 1929) Adamson, 1981 (Pharyngodonidae: Oxyuroidea). *Canad. J. Zool., 59*:1351-1367, 1981.
3. CHABAUD, A.G. *Keys to genera of the Superfamilies Cosmocercoidea, Seuratoidea, Heterakoidea and Subuluroidea. In CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates.* Edited by R. C. Anderson; A.G. Chabaud & S. Willmott. England, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1978. pp. 1-71.
4. DINNIK, J.A. Data on the fauna of freshwater parasitic worms in the Caucasus. (Em russo) *Gorskii Sell'sko-khozyaistvennyi Institut. Kraevaya Gidrobiologieheskaya Stantsiya. Raboty, 3*:87-90, 1930.
5. HOLOMAN, V.L. *Pharyngodon armatus* Waltòn, 1933 (Nematoda: Oxyuridae); description of the male and redescription of the female. *J. Parasitol., 55*:733-736, 1969.
6. PETTER, A.J. & QUENTIN, J.C. *Keys to genera of the Oxyuroidea. In CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates.* Edited by R.C. Anderson; A.G. Chabaud, & S. Willmott. England, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1976. pp.1-30.
7. VOLGAR, L.G. Adaptation of the nematode *Thelandros tba* (Dinnik, 1930) to the peculiarities in the life cycle of its host. (Em russo) *Dokl. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol., 124*:1375-1376, 1959.

ARAÚJO, P. & ARTIGAS, P. T. *Gyrinicola chabaudi* n.sp. (Nematoda, Pharyngodonidae), oxiurídeo encontrado em girinos. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:383-390, 1980/81.

8. WALTON, A.C. Studies on some nematodes of North American frogs. *J. Parasitol.*, *15*:227-240, 1929.

9. ———— Two new nematodes, and notes on new findings of nematodes parasitic in Amphibia. *Proc. U.S. Natl. Mus.*, *82*:1-5, 1933.

10. YAMAGUTI, S. Studies on the Helminth Fauna of Japan. Part 23. Two New species of Amphibian Nematodes. *Jap. J. Zool.*, *7*:603-607, 1938.

11. ———— *Systema Helminthum.* Vol. III. *The Nematodes of Vertebrates.* New York, Interscience Publishers, 1961. Pt. I e II, pp. 1-679 e 680-1261.

Mem. Inst. Butantan
44/45:391-402, 1980/81

OBSERVAÇÕES DO COMPORTAMENTO E DA CÓPULA HETERÓLOGA DE SUCURIS EM CATIVEIRO — *EUNECTES MURINUS MURINUS* (LINNAEUS) E *EUNECTES NOTAEUS* COPE, 1862

Tatiana VEINERT *
Hélio Emerson BELLUOMINI **

RESUMO: Neste trabalho, os autores descrevem observações de comportamento e de cópula heteróloga entre *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes notaeus* Cope, 1862, em cativeiro. A maturidade sexual de fêmeas de *Eunectes murinus murinus* ocorre aproximadamente aos cinco anos de idade quando atingem 320 a 350 cm de comprimento. É registrado o número de cópulas heterólogas e o período de duração. Desses acasalamentos não resultaram filhotes.

PALAVRAS-CHAVE: Cópula heteróloga de Sucuris em cativeiro.

INTRODUÇÃO

As observações referentes a répteis da família Boidae e em particular do gênero *Eunectes*, sucuri, conhecidos pelo avantajado porte e que rivalizam em tamanho com algumas espécies do gênero *Python*, são trabalhosas e de difícil realização, representando anos de paciente dedicação, nem sempre felizes.

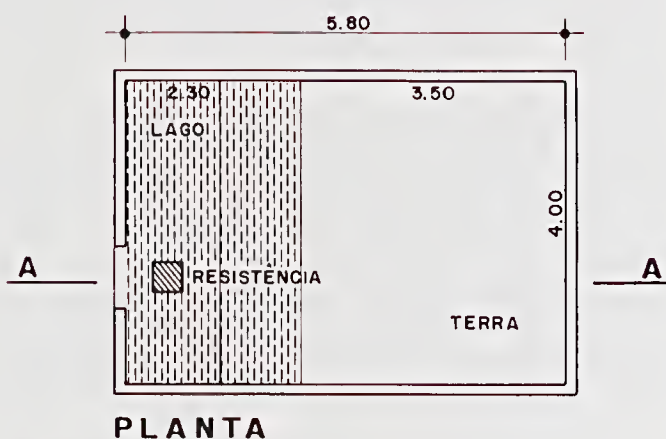
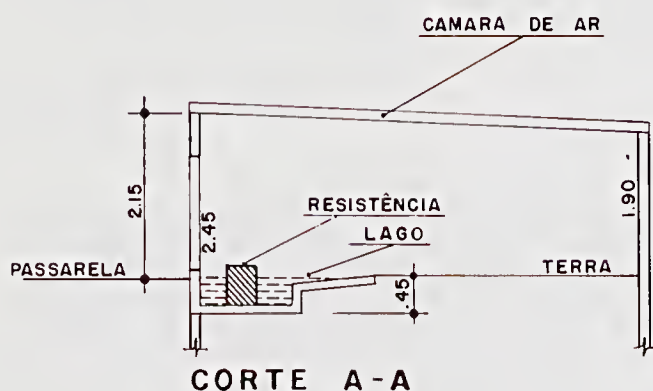
No Brasil, Belluomini e colaboradores, 1976/77 (5) procuraram apreciar, em relação ao gênero *Eunectes*, dados relativos a alimentação, tamanho, nomes vulgares, reprodução, número de filhotes, posição sistemática, acrescentando notas próprias obtidas nos seus trabalhos em 1966 (3) e 1968 (4) na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

Jardins Zoológicos que mantêm sucuris em suas exposições têm publicado trabalhos referentes ao nascimento de ninhadas em cativeiro, sendo o último de nosso conhecimento o de Luttenberger em 1973 (7) e recentemente Deschanel em 1978 (6), do Jardim Zoológico de Lyon, França, que descreveu cruzamento, reprodução e nascimento em cativeiro.

* Fundação Parque Zoológico de São Paulo — Caixa Postal 12.954 — São Paulo, Brasil.
** Instituto Butantan — Caixa Postal 65 — São Paulo, Brasil.

PLANTA DO RECINTO EXPERIMENTAL

Fig. 1 — Planta do recinto experimental.

VEINERT, T. & BELLUOMINI, H. E. Observações do comportamento e da cópula heteróloga de sucuris em cativeiro — *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes Notaeus* Cope, 1862. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:391-402, 1980/81.

Em relação ao comportamento de serpentes da família Boidae em cativeiro, há o trabalho de Barker e col. em 1979 (1), com observações obtidas com exemplares de *Python molurus*.

Há muito sabe-se de casos de cópulas heterólogas entre serpentes, ocasionando geralmente a morte da fêmea. Belluomini e Hoge em 1957/58 (2) estimaram esses acasalamentos na ordem de 1/200.000.

Neste trabalho, realizado no Zoológico de São Paulo, são relatadas observações no comportamento e na cópula heteróloga de sucuris das espécies *Eunectes murinus murinus* e *Eunectes notaeus* em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODO

Quatro exemplares de sucuris foram incluídos neste trabalho:

1. Fêmea de *Eunectes murinus murinus*, *A* de 3,25 m e 15,300 kg, procedente do Rio Feio, Estado de São Paulo em 30-05-76.

2. Macho de *Eunectes notaeus*, *B* de 2,00 m e 5,000 kg, procedente de Sorocaba, Estado de São Paulo, em 17-03-77.

3. Fêmea de *Eunectes murinus murinus*, *C* de 2,90 m e 7,300 kg, procedente do Zoológico de Curitiba, Estado do Paraná, em 11-05-77.

4. Macho de *Eunectes murinus murinus*, *D* de 1,40 m e 1,700 kg, doação de particular em 19-12-78.

I — TERRÁRIO

Ao chegar, as serpentes foram colocadas em terrário com frente de vidro e paredes de zinco, coberto com tampa de tela. A água era aquecida por meio de resistência de aquário de 220v/120w.

A temperatura variava entre 20 e 26°C. Nesse terrário, as serpentes permaneceram da data da chegada até 15-08-79.

ALIMENTAÇÃO

Dado a dimensão do terrário, pequena para o porte dos répteis, dificultando o fornecimento de alimento de tamanho maior, oferecemos apenas gambás, ratos de laboratórios, brancos e pretos e cobaias.

RECINTO EXPERIMENTAL

Em 15-08-79, os répteis foram transferidos para o recinto experimental, medindo 4,00 m de comprimento x 5,80 m de largura x 1,99 m de altura, tendo na parte frontal um tanque de água de 4,00 m de comprimento x 2,00 m de largura e 0,45 m de altura. A área de terra é de 4,00 m de comprimento, 2,50 m de largura e altura de 2,45 m.

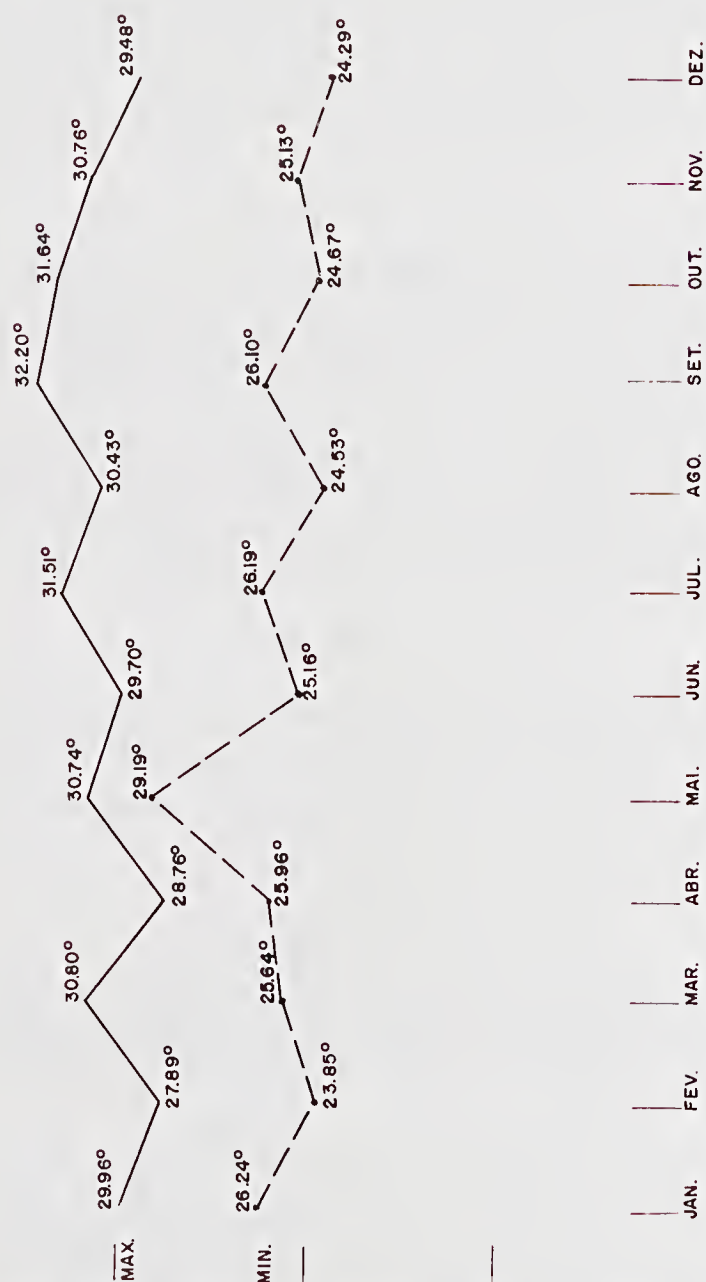



Fig. 2 — Curvas da temperatura do recinto experimental, que abriga os exemplares *A* e *B* (*Eunectes murinus murinus* e *Eunectes notaeus*).

VEINERT, T. & BELLUOMINI, H. E. Observações do comportamento e da cópula heteróloga de sucuris em cativeiro — *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes Notaeus* Cope, 1862. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:391-402, 1980/81.

O recinto foi adaptado às necessidades térmicas das serpentes, sendo coberto com duas camadas superpostas de lona plástica transparente, formando um "colchão de ar" com 0,15 m de altura para uniformizar a temperatura ambiente; três lâmpadas infravermelho de 250w/220v e cinco aquecedores de convecção estão suspensos a uma altura de 1,30 m. A água do tanque foi aquecida por 8 resistências de aquário de 120w/220v. O piso de terra foi coberto com uma camada de feno com espessura de 0,30 m.

A figura 2 mostra a oscilação de temperatura.

Estas instalações permitiram manter a temperatura do meio ambiente e da água, com pequenas oscilações ao redor de 30°C máx. e 25°C mín. (fig. 4).

ALIMENTAÇÃO

A dimensão do recinto experimental permitiu oferecer, como alimento, animais de porte maior ou seja coelhos e cutias.

COMPORTAMENTO

Observações constantes indicaram que há bastante diferença no comportamento de cada animal. A fêmea *A* permanece mais tempo dentro da água e ao sair desta, prefere enrolar-se debaixo do feno sob um dos aquecedores de convecção. O macho *B* prefere a região central do recinto, também sob o feno e raramente procura a água.

Devido a constante movimentação dos avantajados répteis e as vezes a dos animais que lhes servem de alimento, o feno tem que ser trocado a cada 4 meses.

CÓPULAS

No dia 25-06-80, o macho *B* cruzou com a fêmea *A* dentro da água às 13,05 h e até às 18 h ainda encontravam-se em cópula. Em 24-04-81 anotamos outra cópula, agora sob o feno, com duração de 3 h; em 22-05-81 houve outro cruzamento sob o feno, esta vez não se sabendo a duração.

Apesar da mudança de recinto, houve continuidade nos cruzamentos do macho *B* com a fêmea *A*.

RESULTADOS

I — TERRÁRIO

A) *Alimentação*

A alimentação no terrário dos exemplares *A Eunectes murinus murinus*, *B Eunectes notaeus*, *C Eunectes murinus murinus* e *D Eunectes*

VEINERT, T. & BELLUOMINI, H. E. Observações do comportamento e da cópula heteróloga de sucuris em cativeiro — *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes Notaeus* Cope, 1862. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:391-402, 1980/81.

Fig. 3 — Curvas de crescimento entre 1976 e 1981 de *Eunectes murinus murinus* (Exemplar *A*).

murinus murinus foi, inicialmente, rato de laboratório, branco e preto. Como *A* recusava esse tipo de alimento, mudamo-lo para cobaia.

Pelo fato do terrário ser pequeno para alojar esses répteis, freqüentemente o exemplar *A* travava luta com outras serpentes pela posse da presa (cobaia). Para solucionar esse problema, passamos a fornecer primeiro os ratos de laboratório para os exemplares *B*, *C* e *D* e depois cobaia para o exemplar *A*.

B) *Crescimento*

Nesse período as serpentes cresceram e ganharam peso.

C) *Cópulas*

Aproximadamente 1 ano depois de estarem juntos no terrário, os exemplares *A*, *Eunectes murinus murinus* e *B*, *Eunectes notaeus* cruzaram em 05-09-78.

Observamos que o macho *B* cruzou com as duas fêmeas, *A* e *C*. Notamos a preferência do macho *B* pela fêmea *A* dado o maior número de coberturas, sendo 24 vezes contra apenas 2 vezes com a fêmea *C*. A tabela I mostra os dados referentes aos cruzamentos observados no terrário.

Observações feitas num período de 24 dias, entre 05-09-78 e 10-10-78, permitiu-nos constatar que os cruzamentos se davam de uma a duas vezes por dia, com duração que variava entre o mínimo de 15 min. e o máximo de 90 min.

No período noturno não se registraram cópulas, pois as serpentes permaneciam quietas, quase sempre imóveis, apenas reagindo à nossa presença.

II — RECINTO EXPERIMENTAL

A) *Alimentação*

Com a mudança dos répteis para o recinto experimental, em 15-08-79, tivemos condições de alimentar as serpentes com animais de porte maior, como coelho e cutia. Porco doméstico de 15 kg, oferecido exclusivamente ao exemplar *A* não pode ser ingerido devido ao tamanho.

B) *Crescimento*

As figs. 3 e 4 mostram o crescimento e o peso dos animais.

C) *Cruzamentos*

O cruzamento da fêmea *A* com o macho *B* nesse recinto se deu em 25-06-80.

Em 10-07-80, ao ser feita a inspeção de rotina, notou-se que o exemplar *B*, *Eunectes notaeus*, estava com necrose na ponta da cauda, com exposição de vértebras, impondo-se amputação parcial, ocasionando interrupção nos cruzamentos, reiniciados aos 24-04-1981.

Fig. 4 — Curvas do crescimento de *Eunectes notaeus* (exemplar *B*) entre 1977 e 1981.

Fig. 5 — Hemipênis do exemplar *B Eunectes notaeus* momento antes da cópula heteróloga. Assinalado dentro do círculo.

VEINERT, T. & BELLUOMINI, H. E. Observações de comportamento e da cópula heteróloga de sucuris em cativeiro — *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes Notaeus* Cope, 1862. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:391-402, 1980/81.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com os trabalhos de Belluomini e col. (5) as ninhadas de *Eunectes murinus murinus* nascem com tamanho que varia de 70 cm a 80 cm. As curvas de crescimento mostram que aos cinco anos de idade sucuris podem ter 320 cm de comprimento. Estas observações permitem supor que a fêmea de *Eunectes murinus murinus* de 70 cm de comprimento, recebida por Deschanel (6) tinha menos de um ano de idade e ele observou 5 anos depois, quando a fêmea media 325 cm de comprimento, cruzamento com macho da mesma espécie e nascimento de filhotes após 7 a 8 meses.

A fêmea *A* de *Eunectes murinus murinus* do recinto experimental do Zoo de São Paulo, cruzou quando tinha 325 cm de comprimento, com macho de *Eunectes notaeus* e apesar da repetição dessa cópula heteróloga (tabela 1) não resultou fecundação, nem morte da fêmea.

TABELA I

Dados referentes aos cruzamentos das serpentes *A*, *B* e *C* no terrário, com anotação das datas e do tempo da duração em minutos das cópulas.

ANIMAIS	DATA	TEMPO
B e *A*	de 05/09/78 a	
24 cópulas	10/10/78	entre 20' e 90'
B e *C*	27/09/78 e	
2 cópulas	06/10/78	entre 15, e 20,

O controle do exemplar de Deschanel (6) e daquele do presente trabalho, comprova a maturidade sexual aproximadamente aos 5 anos de idade, quando essas fêmeas alcançaram comprimento entre 320 cm a 350 cm.

Os autores (5) encontraram em necrópsias de fêmeas de *Eunectes murinus murinus* dessa idade, ovidutos com ovos corroborando as conclusões acima (fig. 6).

Barker e col. em 1979 (1) observando exemplares de *Python molurus* em cativeiro, verificaram que há luta entre os machos pela posse da fêmea e uma hierarquia social linear dos mesmos. Esse comportamento não foi constatado por nós com os exemplares de *Eunectes* estudados neste trabalho.

Registramos 29 cópulas ao todo com duração mínima de 15 min. e máxima de 295 min., sendo 26 destas no terrário e 3 no recinto experimental.

O maior número de cruzamentos no Zoo de São Paulo deu-se nos meses de setembro e outubro, enquanto Deschanel, 1978 (6), na França, assinala os meses de maio e julho, estação climática da primavera nos dois países.

Fig. 6 — Necrópsia de sucuri de *Eunectes murinus murinus* com pouco mais de 300 cm mostrando ovidutos com ovos.

ABSTRACT: In the present paper, the authors describe observations on the behavior, and heterologous mating of anacondas — *Euneotes murinus murinus* (Linnaeus), and *Eunectes notaeus* Cope, 1862 in captivity. Sexual maturity occurs in *Eunectes murinus murinus* approximately at the age of 5 years, when females reach body lengths of about 320 to 350 cm. The number as well as the duration of heterologous matings are recorded. No young resulted from these copulations.

KEYWORDS: Heterologous mating of Anacondas in captivity.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao médico veterinário, Dr. FAIÇAL SIMON *, pelas sugestões na construção do recinto experimental, à bióloga MARIA DE FÁTIMA DOMINGUES FURTADO **, pelo levantamento bibliográfico, à Senhora SIBYLLE E. HELLER **, pela redação. Ao Setor de Fotocinematografia *, pelas fotografias, GABRIEL ARCANJO DO CARMO *, da equipe de Desenho, pelos gráficos e desenhos, ao Tratador VALDOMIRO FELIZ DA SILVA *, pela dedicação.

* Fundação Parque Zoológico de São Paulo.
** Instituto Butantan.

VEINERT, T. & BELLUOMINI, H. E. Observações do comportamento e da cópula heteróloga de sucuris em cativeiro — *Eunectes murinus murinus* (Linnaeus) e *Eunectes Notaeus* Cope, 1862. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:391-402, 1980/81.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKER, D.G.; MURPHY, B. & SMITH K.W. Social behavior in a captive group of indian pythons, *Python molurus* (serpentes, Boidae) with formation of a linear social hierarchy. *COPEIA*, *3*:466-471, 1979.

2. BELLUOMINI, H.E. & HOGE A.R. Um caso de cópula heteróloga entre *Bothrops* e *Crotalus* (serpentes). Mem. Inst. Butantan, *28*:91-94, 1957/58.

3. BELLUOMINI, H.E. & VEINERT, T. Criação de "sucuris", (Anacondas), *Eunectes murinus* (Linnaeus, 1758). Notas preliminares. Parque Zoológico de São Paulo, Ciênc. Cult., *18*(2):134-135, 1966.

4. BELLUOMINI, H.E.; VEINERT, T. & DISSMANN, F. Dados sobre a biologia de serpentes *Eunectes murinus* — Curva de crescimento e de alimentação em cativeiro (três anos de observação). Anais do III Congresso Nacional — Quinta da Boa Vista. Rio de Janeiro, 1968.

5. BELLUOMINI, H.E.; VEINERT, T.; DISSMANN, F.; HOGE, A.R.; & PENHA, A.M. Notas biológicas a respeito do gênero *Eunectes* Wagler, 1980 "sucuris" (Serpentes Boidae). *Mem. Inst. Butantan*, *40/41*:79-115, 1976/1977.

6. DESCHANEL, J.P. Reproduction of anacondas. *Internat. Zoo Yearbook*, *18*: 98-99, 1978.

7. LUTTENBERGER, F. Die Geburt von Anakondas (*Eunectes murinus* (Linnaeus, 1758) Gefangenschaft, *Aquaterra*, *10*(2):15-21, 1973.

Mem. Inst. Butantan
44/45:403-423, 1980/81

ACCIDENTES HUMANOS POR LAS SERPIENTES DE LOS GÊNEROS *BOTHROPS* Y *LACHESIS*

Juan Silva HAAD *

RESUMEN: Se presentan 93 casos de accidentes humanos por serpientes dcl Género *Bothrops* y dos casos por el Género *Lachesis*. Se hacc el estudio de la semiología de estos accidentes, y con base en el análisis estadístico de la casuística presentada, se formulan los fundamentos para establecer el diagnóstico clínico y diferencial; además se exponen los métodos terapeuticos empleados.

UNITERMOS: Síndromes: *Lachesis; Bothrops*. Serpientes; Crotalinae.

INTRODUCCIÓN

Desde 1973, hasta el primer semestre de 1978, se han estudiado y tratado, en el Hospital Regional de la ciudad de Leticia Amazonas, 93 casos de accidentes humanos, determinados por las serpientes del Género *Bothrops* y dos casos por las serpientes del Género *Lachesis*.

De los 93 casos de accidentes bothrópico, 79 fueron ocacionadas por la especie *Bothrops atrox* y 14 por la subespecie *Bothrops bilineatus smaragdinus*.

La gran morbilidad causada por las serpientes del Género *Bothrops* nos permitió realizar un estudio detallado de la clínica semiológica, como también, de las alteraciones hematológicas y urinarias que provocan los venenos de estas serpientes.

Dos casos de accidentes humanos causados por las serpientes del Género *Lachesis* nos ayudarán a establecer tanto las similitudes como las diferencias clínicas existentes entre estosdos Géneros, cuyo diagnóstico diferencial clínico, es de gran importancia para instaurar una terapeutica racional.

Los casos de accidentes laquéticos relatados son los únicos, hasta el momento actual, descritos en la literatura médica colombiana.

* Jefe del Servicio de Salud del Amazonas — Director Hospital Regional de Leticia — Cirujano General Calificado.

La rareza de los accidentes ocacionados por las serpientes del Género *Lachesis*, nos mantuvo durante 12 años sin conocerla semiología producida por la inyección accidental del veneno de estas serpientes en el hombre. El conocimiento de los signos semiológicos de este grave accidente es una contribución médica importante por lo escasso de la literatura universal existente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un registro detallado de los accidentes ofídicos ocurridos en el Territorio de la Comisaría del Amazonas y mediante la investigación realizada se determinarán los siguientes hechos:

1.º) Circunstancia como ocurrió el accidente.

2.º) Hora en la cual ocurrió el accidente, y tiempo transcurrido entre éste y la consulta médica.

3.º) Lugar del cuerpo donde fue picado.

4.º) Síntomas y signos presentados.

5.º) Alteraciones hemáticas encontradas.

6.º) Distribución por edad y sexo.

Los pacientes atendidos y tratados en el Hospital Regional de Leticia, en el cual hay recurso humano médico y de bacteriólogas especializadas, se les practicarán a todos lo pacientes, además de los exámenes clínicos rutinarios, exámenes de laboratorio para conocer las alteraciones de la protrombina y el fibrinógeno; alteraciones de la morfología globular, como también exámenes de orina con el fin de determinar la presencia de elementos anormales en ésta.

Con base en los signos semiológicos, síntomas y hallazgos de laboratorio clínico, principalmente las alteraciones de la coagulación, causadas por la disminución o consumo de la protrombina y del fibrinógeno, clasificamos los pacientes en tres estados clínicos, con el objetivo de sentar las bases terapeuticas. Los estados clínicos se calificaron en: Estados I, II y III. Se compila toda la casuística ocurrida en el Territorio del Amazonas y se hace el análisis estadístico.

SEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE BOTHRÓPICO

La función venenosa de los Tanatofidios está dirigida fundamentalmente a la conservación de la especie, utilizando el veneno de sus glándulas, principalmente, para matar las presas favoritas que constituye su alimento; en segundo lugar, como medio de defensa contra sus agresores. De los 93 casos de accidente Bothrópico estudiados y tratados 79 fueron ocacionados por el *Bothrops atrox*; el *Bothrops bilineatus smaragdinus* produjo 14 accidentes, esto es el 15,053% y el *Bothrops atrox* es el 84.547%. No hemos comprobado accidentes humanos por las otras representantes del Género *Bothrops*.

HAAD, J. S. Accidentes humanos por las serpientes de los generos *Bothrops y Lachesis*. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:403-423, 1980/81.

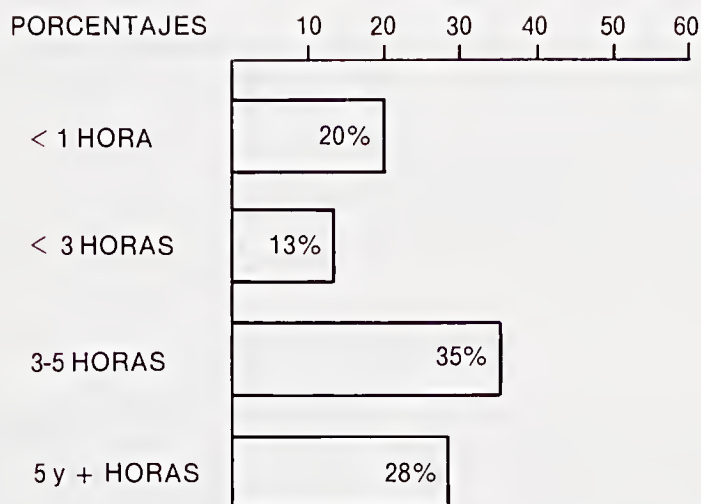



Fig. 1 — Numero y porcentaje del tiempo entre el accidente bothropico y la consulta hospitalaria en 93 casos.

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

EDEMA Y DOLOR 100 %

HEMORRAGIA 40 %

MAREO 23%

NECROSIS 17%

VOMITO 15 %

HEMATURIA MACROSCOPICA 2 %

EQUIMOSIS 2 %

HEMATEMESIS

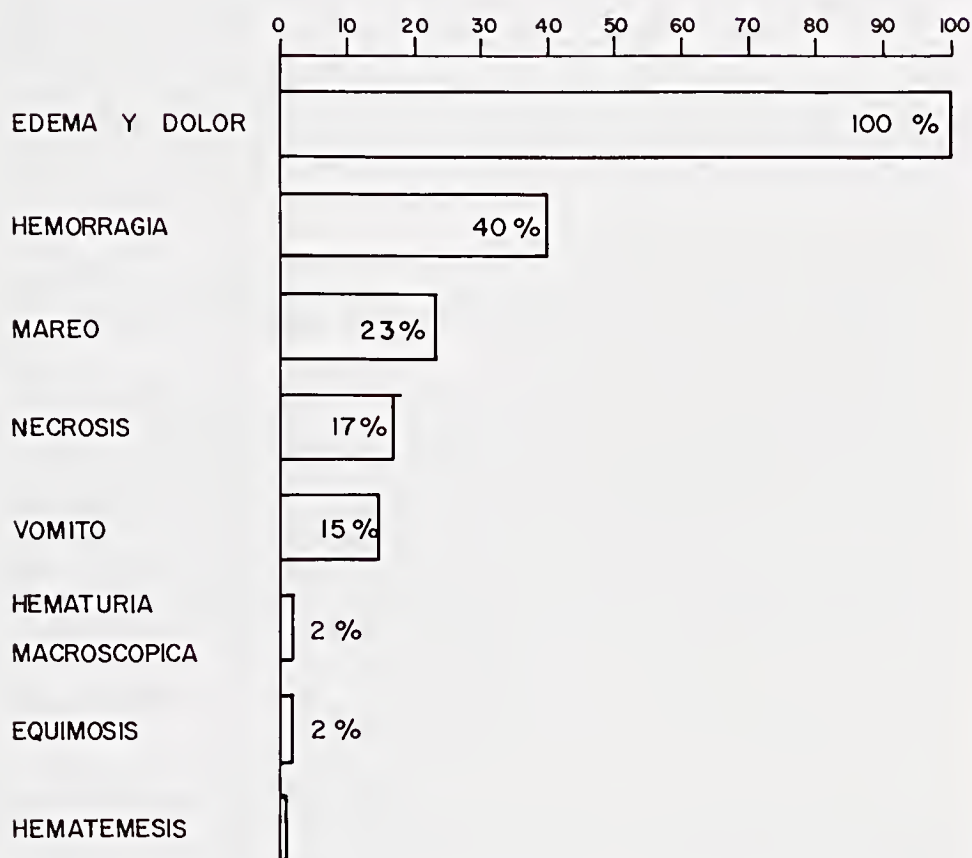



Fig. 2 — Porcentaje de distribución de signos y sintomas en los casos de accidente bothropico.

El análisis de los casos de estos accidentes nos permitió reconocer la existencia de dos síndromes en los que se basó el diagnóstico del accidente Bothrópico:

1.º) SINDROME DOLOROSO

2.º) SINDROME HEMATOLOGICO.

Con el hallazgo parcial o toral de estos síndromes se llega a un diagnóstico correcto.

SINDROME DOLOROSO

El dolor es de aparición inmediata en la zona de la picadura; dolor agudo, de caracter urente, puede extender-se a todo el miembro herido. Este se aprecia edematoso y pueden encontrarse flictenas o ampollas de contenido sero-hemorrágico. Hay calor y rubor. Las lesiones tisulares pueden progresar hacia la necrosis; ésta puede localizarse únicamente al sitio de la picadura, en veces, dependiendo de la gravedad del accidente, la necrosis afecta todo un segmento o un miembro completo.

La gráfica n.º 1 nos muestra que el 20% de los pacientes llegan a consulta en un tiempo menor de una hora. El 13% llega en un tiempo menor a tres horas, el 35% llegan en las primeras cinco horas, después de ocurrido el accidente. Sin embargo, a pesar de que el mayor volumen de pacientes está entre las cinco horas y más, hemos observado que la mortalidad hospitalaria es muy baja en el accidente Bothrópico. La mortalidad hospitalaria global en todo el Territorio del Amazonas estudiado durante 15 años es del 0.5%.

La gráfica de la fig. n.º 2 nos señala un hecho semiológico importante y es el de que el edema y el dolor están presentes en el 100% de los pacientes. El dolor es intenso y de aparición instantánea; el edema se inicia en los primeros minutos de la picadura.

Apreciamos en esta misma gráfica que el 40% presentaron hemorragias por diferentes vías, pero principalmente la forma más común de aparición es el sangrado por la mucosa gingival, o gingivorragia, presente en el 70% de los pacientes. Se observa que las equímosis, la hematuria macroscópica son de aparición más rara, encontrándose este tipo de sangrado solo en el 2% de los pacientes. Las hematemesis son las formas de sangrado de menor frecuencia, y cuando se presenta tiene un gran valor semiológico, indica que se trata de un Estado III de nuestra clasificación, en donde el fibrinógeno está notablemente disminuido. Las necrosis se presentaron en el 17% de los pacientes.

La gráfica n.º 3 señala la relación de aparición entre el edema, dolor y hemorragia, según los diferentes grupos etareos.

Se observa que el edema, el dolor y la hemorragia están presentes en el 100% en los menores de 15 años, en cambio la hemorragia está presente en el 27% de 15 a 44 años, pero en cambio el edema y el dolor apareció en el 100%. Esto nos indica que la inyección del veneno Bothrópico en los niños es mucho más grave que en los adultos; esto se explica

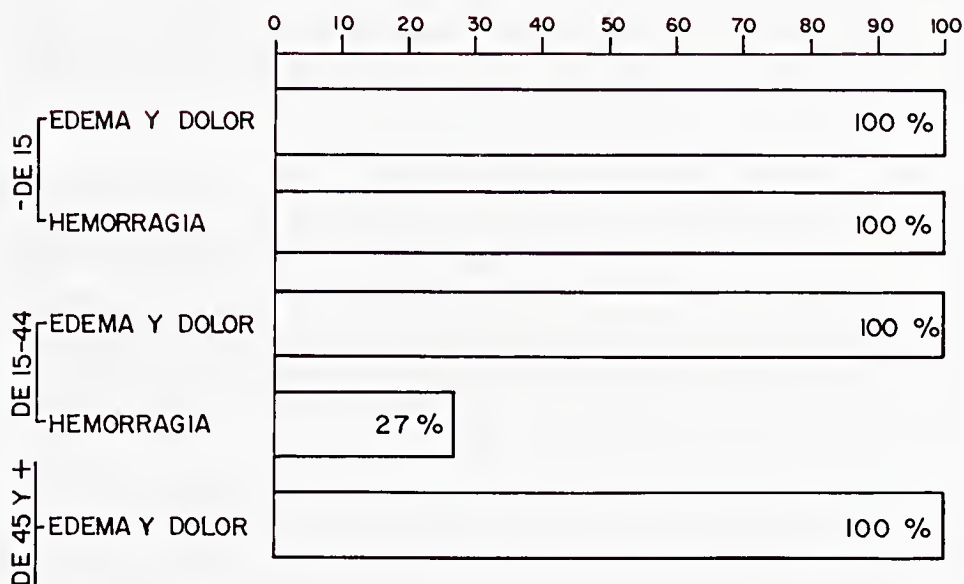



Fig. 3 — Numero y porcentajes de edema dolor y hemorragia en 93 casos de accidente bothropico segun grupos etareos.

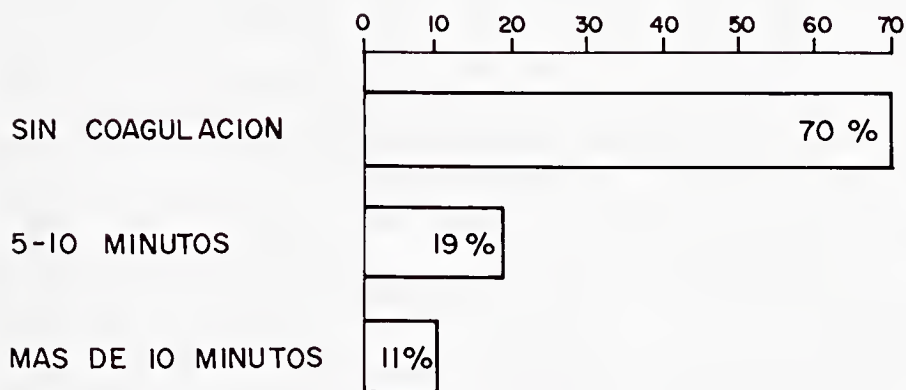



Fig. 4 — Numero y porcentajes de las alteraciones del tiempo de la coagulación en 93 casos de accidente bothropico.

por la relación entre peso corporal y dosis de veneno inyectado, que lógicamente es siempre mayor en el niño.

La triada de dolor, edema y hemorragia como se aprecia en esta gráfica, estuvo presente en todos los grupos de edades, por lo tanto esta tríada semiológica es importante en el diagnóstico del accidente Bothrópico.

SINDROME HEMATOLOGICO

Antes de exponer los diferentes elementos que conforman este síndrome, es importante ver los resultados del estudio de las alteraciones de la coagulación bien por disminución o consumo de la protrombina y del fibrinógeno demonstrados en las figuras n.ºs 4 y 5. La gráfica dela fig. n.º 4 nos indica que el 70% de los pacientes tenía pérdida de la coagulación sanguínea, determinada esta alteración, por el tiempo de coagulación, (Método de White) ; el tiempo de coagulación se determinó en el momento del ingreso antes de recibir suero antiofídico.

Se comprobó que la incoagulabilidad que presentó el 70% delos casos atendidos y tratados por nosotros, fue causada, principalmente, por el consumo de la protrombina, ya que en todos los pacientes de este grupo, el tiempo de protrombina fue siempre mayor de 26 segundos, lo que significó un alto consumo de este factor, y en la mayoría, ausencia completa de protrombina circulante. Hemos observado y comprobado experimentalmente, que la protrombina es el factor que primero y más rápido se consume.

Las alteraciones del Fibrinógeno se analizan en la gráfica de la Fig. n.º 5, en la cual vemos que el 37.1% de los pacientes, cuya sangre era incoagulable, presentaban una concentración de este factor de menos de 100 mgs por ciento. Entre 100 mgs y 249 estuvo el 47,9% y el 15% de los pacientes tenían un fibrinógeno normal esto es entre 250 y 450 mgs por ciento.

Las alteraciones de las celulas sanguíneas y de la fórmula blanca, expuestas en la Fig. n.º 6 nos indica que el 46.4% de los pacientes presentaban un número de leucocitos normales. El 53.6% tenían más de 10.000 leucocitos de mm^3.

Es interesante anotar, que las plaquetas están normales en el 73% de los pacientes y que solo en un 27% de ellos se observa un aumento de éstos elementos. Nunca hemos observado disminución de las plaquetas en los pacientes tratados por accidente Bothrópico.

El síndrome hematológico está constituido y se puede resumir en los siguientes hallazgos:

1.º) Incoagulabilidad sanguínea causada por disminución o consumo total de la protrombina y/o del Fibrinógeno y de otros factores más de la coagulación.

2.º) Poiquilocitosis, anisocitosis y crenación globular. La hemolisis es rara en el accidente Bothrópico y solo la hemos visto en un caso de nuestra casuística.

HAAD, J. S. Accidentes humanos por las serpientes de los generos *Bothrops y Lachesis*. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:403-423, 1980/81.

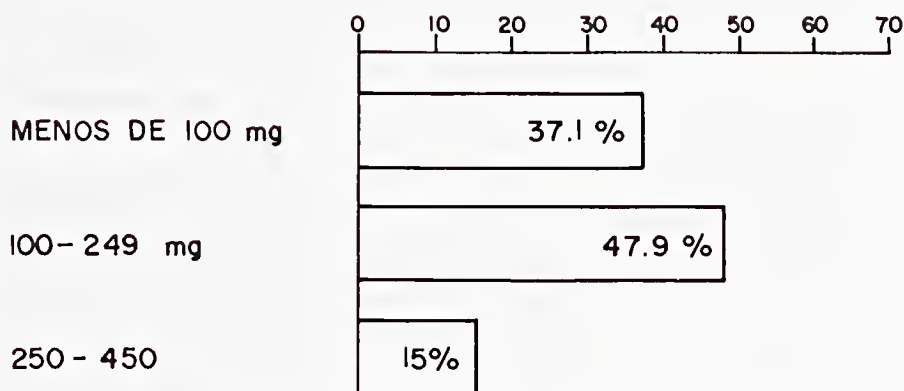



Fig. 5 — Numero y porcentaje de las alteraciones del fibrinogeno en 93 casos de accidente bothropico.

0 10 20 30 40 50 60 70 80

LEUCOCITOSIS
DE 5.000 - 10.000
46.4 %
MAS DE 10.000
53.6 %

PLAQUETAS
DE 250.000- 450.000
73 %
MAS DE 450.000
27 %

ERITROSEDIMENTACION
DE 0 - 4 mm/hora
53.6 %
DE 5 - 15 mm./hora
17 %
MAS DE 15 mm/hora
29.4 %

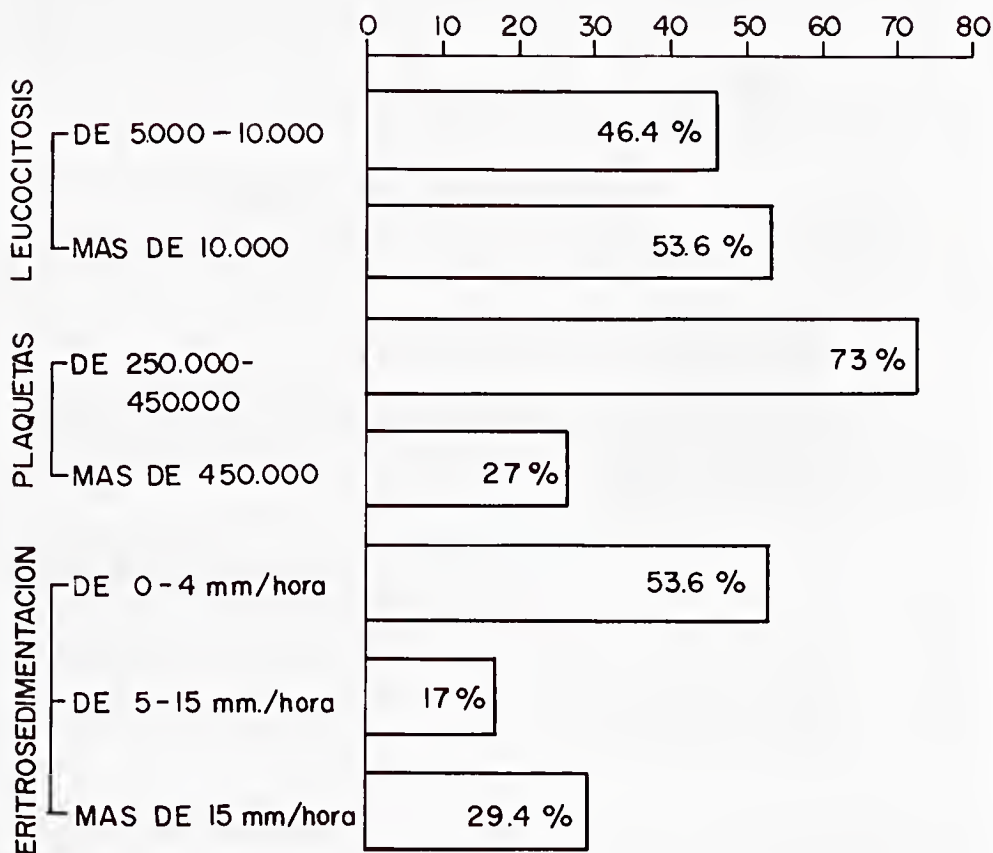



Fig. 6 — Numero y porcentajes de las alteraciones de las celulas sanguineas y de la formula blanca en 93 casos de accidente bothropico.

Las modificaciones de la eritrosedimentación las consideramos como un signo de valor muy importante en el diagnóstico del accidente Bothrópico, ya que el 53.6% de los pacientes tienen abolida o desminuida esta prueba. Tal alteración corre pareja con las modificaciones del Fibrinógeno que se aprecían en los pacientes, ya que el 96% de nuestros pacientes está alterada la concentración del Fibrinógeno.

Las modificaciones morfológicas de los eritrocitos es otro hallazgo biológico interesante ya que el 50% presentan uma morfologia eritrocitica alterada, caracterizada por la presencia de los crenocitos o globulos rojos en estrellas, lo mismo que la agregación de estas celulas es un hallazgo común. El veneno Bothrópico provoca alteraciones de la membrana globular roja.

3.º) Leucocitos, más intensa quanto mayor sean las lesiones necróticas del miembro herido.

4.º) Micro-embolismo pulmonar y a otros órganos; raras veces embolismo masivo de grandes vasos arteriales y venenosos.

5.º) El 2% de nuestros pacientes presentan lesiones de los endotelios capilares expresadas clínicamente por las equímosis y el aumento del tiempo de sangría. El veneno Bothrópico lesiona los endotelios vasculares, determinando aumento de la permeabilidad capilar, y muchas veces destruyendo al pared vascular.

Las alteraciones urinarias encontradas fueron:

1.º) Albuminuria mayor 200 mgs. el 26%.

2.º) Hematuria microscópica el 8.3% de los pacientes.

3.º) Cilindruria, caracterizada por cilindros hialinos, granulosos (en un 2%) y hemáticos en un 10%.

4.º) Hemoglobinuria en un 2%.

5.º) Hematuria macroscópica 2%.

Como se puede ver las alteraciones urinarias son menos frecuentes en los accidentados, y revisten poca gravedad, a excepción de la hematuria macroscópica, que cuando apareció correspondió siempre a pacientes del Estado III de nuestra clasificación.

La figura n.º 7 nos ilustra sobre la frecuencia de los estados clínicos I- II y III. Se observa que el 66% de pacientes cuando ingresa al Hospital están dentro del Estado II. Estos pacientes tienen un Fibrinógeno disminuido con concentraciones de este factor entre 100 y 249 mgs. por ciento. El 30% de los pacientes ingresan en el Estado III, esto significa que tienen una concentración de Fibrinógeno menor de 100 mgs. por ciento. Solo un 4% en esta casuística se clasificaron en el Estado I, es decir pacientes sin alteración de la clasificación sanguínea.

La distribución porcentual de las picaduras en las diferentes regiones del cuerpo se puede apreciar en la figura n.º 8 donde vemos que el 68.6% de las picaduras están localizadas en el miembro inferior, el 22.6% están situadas en la mano y solo 1.1% en la cara.

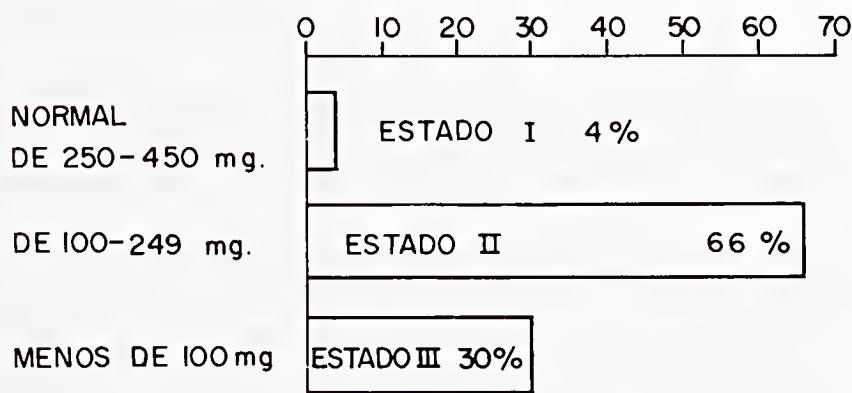



Fig. 7 — Porcentaje de estados clínicos en casos de accidente bothropico.

HOSPITAL REGIONAL "LETICIA"
AMAZONAS-COLOMBIA
1.973-1.981

LOCALIZACION	%
1° PIE	43.0
2° PIERNA	22.6
3° MUSLO	3.2
4° MANO	22.6
5° ANTE BRAZO	4.3
6° BRAZO	2.1
7° ESPALDA	1.1
8° CARA	1.1
TOTAL	100.0

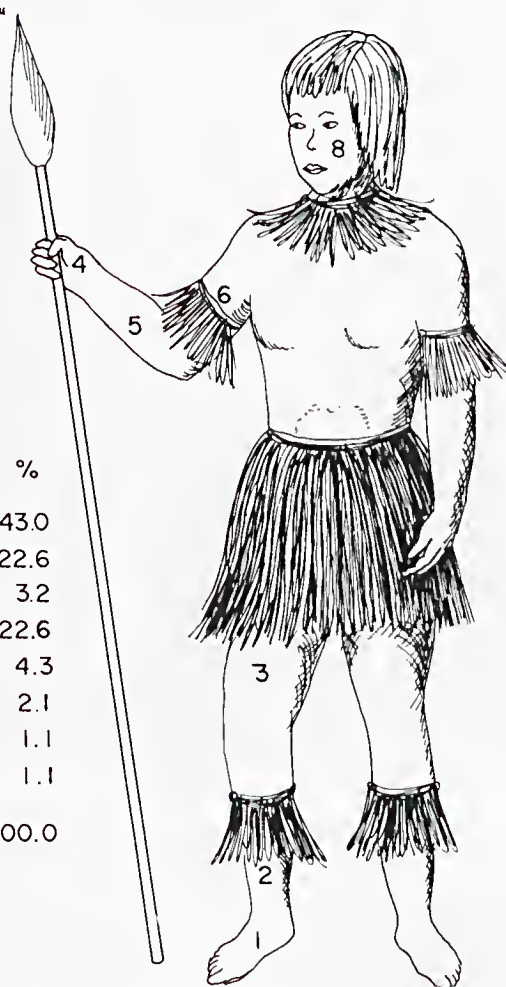



Fig. 8 — Distribución porcentual de las picaduras por serpientes del genero bothrop en 93 casos.

Todos los accidentes de cara fue determinada por la especie *Bothrops bilineatus smaragdinus*.

La Fig. 9 muestra la distribución por sexo y grupos etareos, los hombres representan el 64% de los accidentados, las mujeres el 27% y los niños el 9%. El niño de menor edad picado por un *Bothrops atrox* es de tres años, y la picadura se localizó a nivel de la región escapular derecha.

Los indígenas del Territorio del Amazonas, a pesar de tener un excelente conocimiento de la ofidiofauna de la región no ponen en practica las normas elementales de prevención del accidente ofídico. Desecham el calzado, lo que contribuye a incrementar la incidencia de los accidentes.

En el Territorio del Amazonas hay un alto porcentaje de picaduras localizadas en la mano; esto es explicable pues dicho territorio es el paraiso del *Bothrops bilineatus smaragdinus* serpiente que como ya expusimos en las páginas anteriores es arborícora; pero a pesar de estar en el reino de la mencionada serpiente es muy baja la frecuencia de picaduras en la cara: 1.1%.

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DEL ACCIDENTE BOTHRÓPICO

Con fines terapeuticos clasificamos en tres estados clínicos los accidentes Bothrópicos:

ESTADO I: Paciente que cinco horas después del accidente presenta: dolor y edema localizado al sitio de la picadura o extendido a todo el segmento; tiempo de coagulación, normal; tiempo y concentración de protrombina normales. Fibrinógeno normal.

ESTADO II: Dolor, edema, flictenas o ampollas de contenido seroso o serohemático en la zona herida o cercana a ella. Aumento o desaparición del tiempo de coagulación. Disminución o consumo total de la protrombina. Fibrinógeno normal o disminuido hasta 100 mgs. El 47.9% de los pacientes estudiados correspondían al Estado II.

ESTADO III: Dolor, edema, vesículas o ampollas de contenido seroso o serohemáticos; necrosis en el área picada. Incoagulabilidad sanguínea. Consumo total de la protrombina; fibrinógeno menor 100 mgs. Shocke: este síndrome, por si solo, constituye un Estado III. Cuando la inyección del veneno es intravascular, no hay edema; el dolor es menos intenso, pero las alteraciones hemáticas son severas. El 37.1% de nuestros pacientes llegan en Estado III.

SEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE LAQUÉTICO

El conocimiento de la semiología del accidente humano determinado por las serpientes del Género Laquético, se basa en el estudio de sólo dos casos que permiten hacer un análisis de los aspectos más destacados de este raro accidente, a la vez reconocer por su semiología y sintoma-

Fig. 9 — Distribución por sexos y grupos etareos en 93 casos de accidente bothropico.

tología propria, sus diferencias con el accidente Bothrópico. El diagnóstico diferencial clínico es de suma importancia para establecer una terapéutica específica.

En los casos que comentamos se demostró que la serpiente era *Lachesis muta muta*, verificados por el autor. Una de estas serpientes midió 2.65 metros (primer caso) y la segunda 1.85 metros.

CASO NO. 1- H.C. NO. 14955. HOSPITAL REGIONAL DE LETICIA-AMAZONAS

Paciente masculino de 42 años, residente en Leticia. Ingresa al servicio de urgencias el día 11 de noviembre de 1975, por que 15 minutos antes fue picado por una serpiente "VERRUGOSA" en el antebrazo izquierdo, sobre la cara anterior, a nivel del tercio inferior (ver figuras n.ºs 10, 10-A y 10-B).

En el momento del ingreso revela los seguientes dátos:

1.º) Intenso dolor en el sitio de la picadura.

2.º) Sangrado por los orificios, bien marcados, que dejaron los dientes inyectores del veneno.

3.º) Cólicos abdominales intensos.

4.º) Deposiciones diarréicas abundantes.

5.º) Tensión arterial de 50 mm la sistólica, diastólica inaudible.

6.º) Bradicardia de 49 por minuto.

Al examen clínico se encontró paciente pálido, com marcado pánico, pulsos periféricos débiles, pero rítmicos, con visión borrosa y mareos. A la auscultación cardíaca se encuentran ruídos apagados; se queja en forma constante de dolores abdominales con características de cólicos; la auscultación abdominal revela marcado aumento del peristaltismo intestinal. El antebrazo izquierdo es muy doloroso tanto a la palpación como a la movilización; aparecen bien evidentes los dos orificios que dejaron la entrada de los dientes inyectores del veneno; hay sangrado escaso por los orificios de la picadura; con edema localizado a este sitio.

Los exámenes complementarios proporcionaron los siguientes datos:

1.º) Tiempo de coagulación de 3½ minutos.

2.º) Tiempo de sangría 2 minutos.

3.º) Fibrinógeno: 350 mgs. x 100.

4.º) Eritrosedimentación: 15 mm.

5.º) Tiempo de protrombina: 20 segundos.

6.º) Morfología globular hemática: normal.

7.º) Plaquetas: 300.000. Morfología normal.

8.º) El examen parcial de orina no mostró anormalidades.

Fig. 10

Fig. 10-A

Fig. 10-B

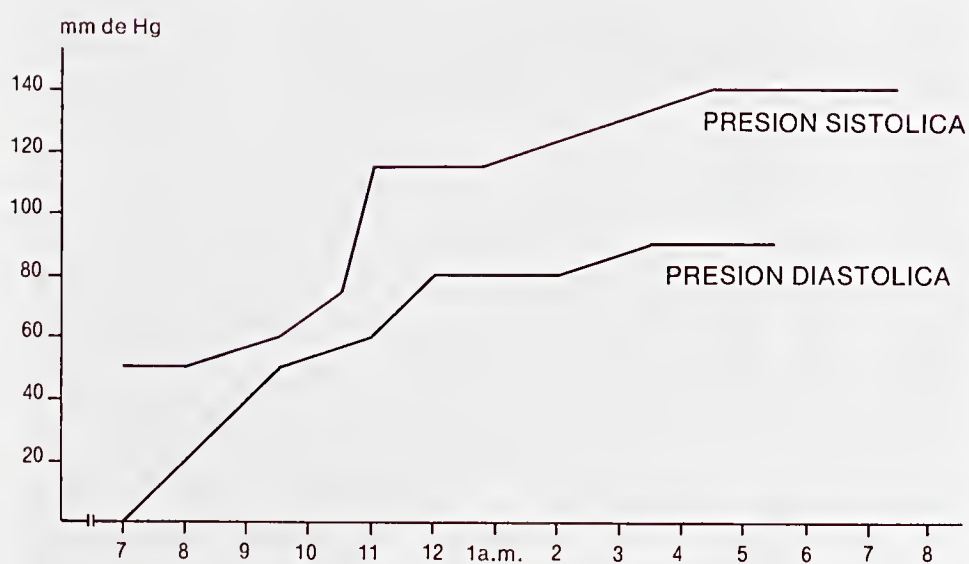



Fig. 11 — Primeiro caso de accidente laquetico (História clínica n.º 14.955)

Tres horas después del accidente el edema se ha extendido a todo el antebrazo y el dolor persiste. A nivel de la zona picada aparecen pequeñas vesículas de contenido seroso que cuatro horas más tarde se agrandan hasta tener un diametro de 6 cms. en su mayor eje.

Tuvo 12 deposiciones diarréicas desde la hora del ingreso (7,05) hasta las 12 M. La gráfica de la figura N.º 11 muestra la evolución de la tensión arterial, 3 y 2 horas después del accidente se normalizan las cifras tensionales, desaparecenlos cólicos abdominales y disminuye notoriamente la diarrea. Los exámenes complementarios en los días siguientes nos mostraron anormalidades. El edema y las ampollas del sitio herido desaparecieron en forma total, 7 días después del accidente. Permaneció 14 días hospitalizado.

CASO N.º 2 — H.C. N.º 16059

Mujer de 30 años, originaria y residente en Leticia, ingresa al Servicio de urgencias, el día 11 de julio de 1977, porque 8 horas antes había sido picada por una serpiente "VERRUGOSA" *(Lachesis muta muta)* en la cara externa de la pierna derecha, a nivel de su tercio medio. El examen de ingreso muestra los siguientes datos clínicos sobresalientes:

1.º) Sangrado permanente por los orificios de la picadura: a nível de cada uno de éstos se encuentra una heridade 2½ cms. que interesan la piel y el tejido celular subcutáneo. Las heridas fueron practicadas con machete por su esposo, con sangrado posteriorabundante. Fig. N.ºs 12 y 12-A.

2.º) Intensa palidez de la piel y las mucosas.

3.º) Acentuado dolor y edema de toda la pierna herida.

4.º) Dolores abdominales, tipo cólico, acompañados de diarrea sanguinolenta.

5.º) Tensión arterial de 60x40 mm Hg.

6.º) Frecuencia cardíaca: 50/minuto.

7.º) Ruidos cardíacos velados.

La anamnesis suministra datos de gran interés clínico: el accidente ocurrió 5 horas antes y el primer síntoma en aparecer fue el dolor, de carácter urente, localizado en lugar de la herida. Pocos minutos después presentó lipotimias acompañadas de vómitos y visión borrosa; intensos cólicos con deposiciones diarréicas que una hora después se tornan sanguinolentas.

El examen del abdomen demuestra aumento del peristaltismo intestinal y dolor difuso a la palpación. El miembro herido está dematoso y acusa dolor intenso a la palpación y movilización.

Hay sangrado permanente a través de los orificios dejados por la picadura y por los bordes de las heridas ya señaladas.

Fig. 12

Fig. 12-A

Los exámenes complementarios arrojaron los siguientes resultados:

CUADRO HEMATICO:

Hematíes:	2.500.000
Leucocitos:	12.600
Neutrófilos:	70%
Linfocitos:	27%
Eosinófilos:	3%
Hematocrito:	25%
Hb:	8.3%

Recuento de plaquetas: 200.000. Morfología globular normal. Tiempo de coagulación indefinido: Tiempo de sangría indefinido.

Tiempo de protrombina: 9.

Fibrinógeno: 80 mg.x%.

Examen parcial de orina: normal.

La gráfica de la figura N.º 13 muestra la evolución de la presión arterial.

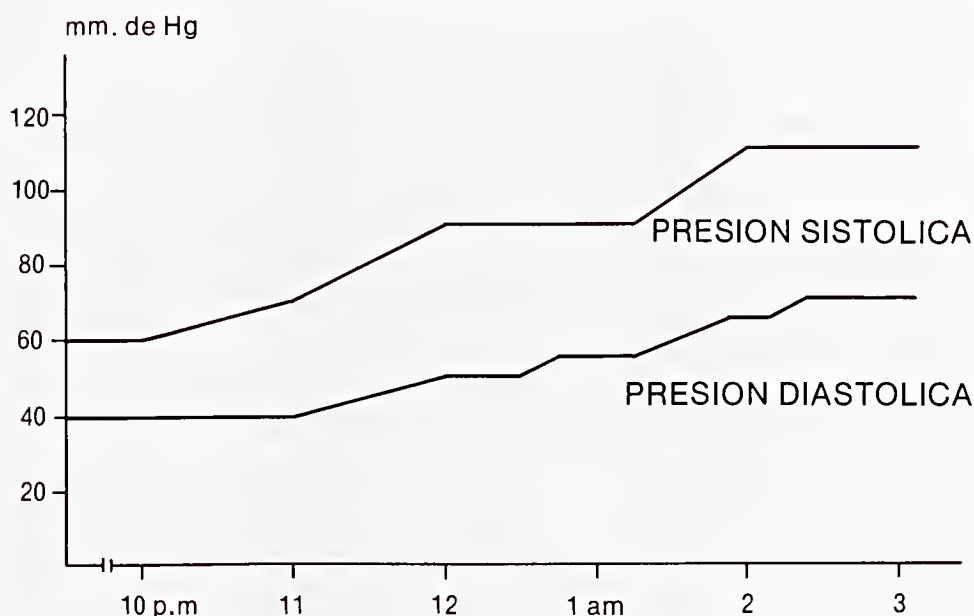



Fig. 13 — Segundo caso de accidente laquetico (História clínica n.º 16.059)

El análisis del cuadro clínico del accidente Laquético y los elementos semiológicos encontrados en los casos estudiados, permiten estructurar los siguientes síndromes:

1.º) Doloroso

2.º) Cardiocirculatorio

3.º) Abdominal

4.º) Hematológico.

El dolor se localiza en el miembro herido; aparece inmediatamente con la picadura y se extiende a todo el segmento con el correr del tiempo. El edema acompaña al dolor. Pueden aparecer, alrededor de la zona picada, vesículas y ampollas de contenido seroso e serohemático en las primeras cinco horas del accidente.

El síndrome cardiocirculatorio se caracteriza por la rápida aparición de una hipotensión arterial severa (en los primeros 15 minutos), con lipotimias y perturbación de la agudeza visual. *Bradicardia acentuada con velamientos de los ruídos cardíacos.*

El síndrome abdominal identificado por la aparición de una diarrea súbita, acompañada de intensos cólicos. La diarrea se puede tornar sanguinolenta en la medida en que aparecen los fenómenos de incoagulabilidad sanguínea.

El síndromc hematológico caracterizado por la disminución o consumo de la protrombina y el fibrinógeno con la resultante incoagulabilidad y sus manifestaciones hemorrágicas.

La semiología del accidente laquético queda resumida en las figuras N.ºs 14 y 14-A.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Los principales rasgos semiológicos nos permiten precisar el diagnostico diferencial, son los siguientes:

1.º) En el accidente Laquético se presenta un síndrome cardiocirculatorio de aparición rápida, en los primeros 15 minutos del accidente, caracterizado por hipotensión arterial severa, bradicardia con velamiento de los ruídos cardíacos y lipotimias acompañadas de visión borrosa, todo explicable por la brusca hipotensión que desencadena la inyección del veneno de este serpiente.

2.º) Un cuadro abdominal, acompañado de intensos cólicos y diarrea, explicables por el marcado aumento del peristaltismo que produce el veneno de la *Lachesis*.

En los accidentes Bothrópicos estudiados por nosotros nunca hemos encontrado ni la bricardia, ni el cuadro diarréico doloroso de instauración rápida. Los casos de hipotensión arterial que tuvimos ocasión de tratar fueron siempre de aparición tardía, 10 horas o más después del accidente y consecuencia de la hipovolemia resultante, debido a las hemorragias en sus diferentes formas, por disminución o consumo de los diferentes factores de la coagulación.

Fig. 14

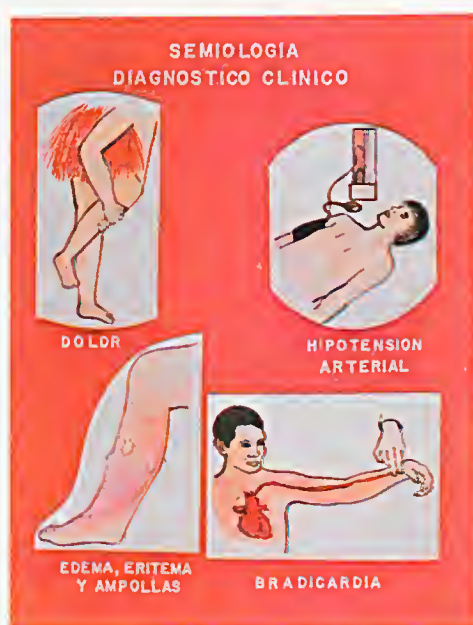



Fig. 14-A

La bradykinina, histamina y calicreina, producidas en forma rápida, por acción del veneno laquético, explicaría el síndrome cardiocirculatorio y el cuadro de diarrea súbita y dolorosa ya señalados. Al igual que el veneno bothrópico, el de la *Lachesis muta muta* es coagulante e histolítico.

En síntesis, existen suficientes criterios clínicos para hacer el diagnóstico diferencial entre el accidente laquético y el Bothrópico y poder así instaurar una terapéutica racional de estos accidentes.

TERAPEUTICA DEL ACCIDENTE LAQUETICO

Los dos casos de accidentes Laquético que acabamos de analizar, en sus aspectos semiológicos y clínicos, fueron tratados obteniéndose resultados satisfactorios con las siguientes medidas terapéuticas:

1.º) Ambos pacientes recibieron SUERO ANTIOFÍDICO PURIFICADO, elaborado por el Instituto Butantan; este suero por cada centímetro cúbico neutraliza 1.0 mg de veneno Bothrópico *(Bothrops jararaca)*. El primer caso tratado, H.C. N.º 14955, picado por una *Lachesis* de 2.05 m recibió 30 ampolas aplicadas por la vía venosa disueltas en 500 cc. de una solución de Dextrosa al 5% en goteo rápido. Esta cantidad de suero Antiofídico neutraliza 300 mg de veneno Crotalico y 450 mg de veneno Bothrópico.

El segundo paciente, H.C. N.º 16059 picado por una *Lachesis* de 1,50 m recibió 20 ampollas del mismo suero y por la misma vía.

2.º) Ambos pacientes recibieron como terpéutica complementaria para corregir el síndrome Diarréico doloroso y la bradicardia, Sulfato de Atropina por la vía venosa, iniciando con dos ampollas de 0.5 mg y continuamos con una cada 4 horas, hasta obtener la normalización de la frecuencia cardíaca y del pulso.

3.º) Se usó el Effortil (Clorhidratoetil-norfenil en ampollas) sustancia de acción simpaticomimética. Iniciamos con dos ampollas aplicadas por la vía venosa y continuamos con una cada 4 horas, hasta obtener la normalización de la presión arterial.

4.º) Hidratación con solución de Ringer y Dextrosa al 5% de acuerdo con las pérdidas y requerimientos básicos calculados para cada paciente.

El primer paciente no recibió transfusión sanguínea. El segundo recibió 2000 cc de sangre fresca: 1500 cc el primer día del ingreso, y 500 cc el segundo día.

De las medidas terapéuticas instauradas, para tratar los únicos dos casos de accidente Laquético, existentes y relatados hasta el momento en la literatura médica colombiana, concluimos que el suero Antiofídico (I.B.) es efectivo contra la picadura de la *Lachesis muta muta*.

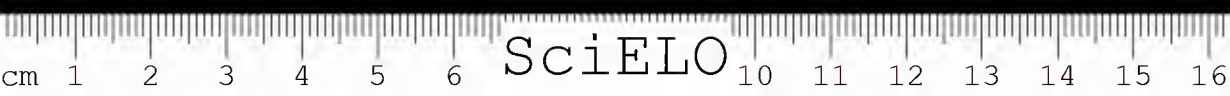
CONCLUSIÓN

La inyección del veneno Laquético en el hombre, estudiado en dos pacientes atendidos y tratados en el Hospital Regional de Leticia, Ama-

zonas, Colómbia, permitió conocer un cuadro multisindrómico, que por sus características clínicas y semiológicas nos ayuda a diferenciarlo del accidente Bothrópico.

El tratamiento hecho con suero Antiofídico del Instituto Butantan neutralizó satisfactoriamente el veneno Laquético. Son necesarias la atropinización y el empleo de sustancias simpaticomiméticas, lo mismo que la aplicación de líquidos por la vía venosa para corregir la hipotensión severa que se apresenta en estos casos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VAN MIEROP, L.H.S. Poisonous snakebite. *Fla. med. Ass.*, *63*(3), 1976.
2. SAAVEDRA, D.; RESTREPO, A. & CANO, M.N. Ofidiotoxicosis Bothropica en Colombia. Parte I. *Antioquia méd.*, *25*(1), 1975.
3. DIAZ, G.O. Accidentes por animales ponzoñosos. *Trib. med.*, *42*(10), 1971.
4. WATT, H.C. JR. Poisonous snakebite treatment in U.S.A. *J. Amer. med. Ass.*, *240*(7), 1978.
5. ODEN, L.H. JR. Historia de una mordedura de ofidio. *Consulta*, *2*(6): 41-46, 1975.
6. FORNALICK, F.K. The influence of snake venoms of fibrinogen conversion and fibrinolisis. *Mem. Inst. Butantan*, *33*(1):179-188, 1966.
7. ROSENFELD, G. Accidentes por animais peçonhentos, serpentes, aranhas e escorpiões in Veronesi, R. *Doenças infeeciosas e parasitárias*. 2.ª ed. Rio de Janeiro, Editorial Guanabara, 1962. p. 872-887.
8. ROSENFELD, G.; NAHAS, L. & KELEN, E.M. Coagulant and hemolytic properties of some snake venoms in Bücherl, W. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press Inc., 1967. 1:229-271.
9. ARNOLD, R. What to do about bites and stings of venemous animals. London, Colliers Mac-Millan Pub., 1973.
10. DAVID, J.C. & FERNANDEZ, S.M. Serpientes venenosas de Venezuela, diagnóstico, pronóstico y tratamiento del accidente ocídico.
11. EGBERG, N. On interaccion of serum proteins with Thrombin-Like — Enzime from *B. atrox* venoms. *Thromb. Res.*, *1*:637-640, 1972.
12. NAHAS, L.; DEUSOU, K.W.E. & FARLANE, M. Study of the coagulant action of eight snake venoms. *Thromb. Diath. haemorrh.*, *31*:356-367, 1964.
13. NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. & BARROS, M.A.R. Thrombin Like and Factor "X" activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Hemost.*, *41*(2):314-328, 1979.
14. HENRIQUES, O.B.; MANDELBAUN, F.R. & HENRIQUES, S.B. Proteolytic enzimes of Bothrops venom. *Mem. Inst. Butantan*, *33*(2):359-370, 1966.
15. ROSENFELD, G.; NAHAS, L. & KELLEN, E.M. Proteolytic of some snake venoms in Bücherl, W. — *Venomous animals and theirs venoms*. New York Academic Press, Inc., 1967, v. 1.
16. CISCAR, F. & FARRERAS VALENTI, P. Diagnóstico hematológico, laboratório y clínico.
17. WINTROBE, M.M. Hematologia clinica. Buenos Aires, Editorial Intermedica, 1969.
18. STORMORKEN, H. & OWREN, P.A. Physiopathology of hemostasis. *Semin. Hematol.*, *8*:3-29, 1971.
19. TOCANTINS, L. & KAZAL, L. Coagulación de la sangre hemorragia y trombosis. Barcelona, Editorial Científico-Medico, 1969.

Mem. Inst. Butantan
44/45:425-438, 1980/81

COMPLÉMENTS À LA DESCRIPTION DU SCORPION BRÉSILIEN *OPISTHACANTHUS CAYAPORUM* VELLARD, 1932 (SCORPIONES; SCORPIONIDAE)

Wilson R. LOURENÇO *

RÉSUMÉ: Cet article est une contribution à la connaissance systématique d' *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932. L'espèce est redécrite à partir de deux exemplaires types et de 81 exemplaires récoltés dans les États du Pará et Goiás au Brésil.

La variabilité de certains caractères comme par exemple le nombre de dents des peignes, est analysée et présentée en tableaux. Les résultats démontrent que la distinction des sexes est parfaitement possible pour *O. cayaporum* à partir du nombre de dents des peignes et celà à tous les stades du développement.

UNITERMES: *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932; Scorpionidae.

INTRODUCTION

Au cours de sa mission dans les régions de Goiás et de l'Araguaia, Vellard (1932) a découvert une nouvelle espèce d'*Opisthacanthus* qu'il appelle *Opisthacanthus cayaporum* en hommage aux indiens Cayapos, parmi lesquels il a séjourné.

Malgré la très bonne description présentée par Vellard en 1932, cette espèce demeure incomplètement connue, la description de Vellard négligeant certains caractères considérés à l'époque de moindre importance mais qui aujourd'hui sont devenus fondamentaux pour la systématique; s'est le cas de la trichobothriotaxie et de la morphologie de l'hémispermatophore.

Après le travail de Vellard (1932), cette espèce a été redécrite par Mello-Leitão (1945), qui s'est borné à traduire la description de Vellard.

---

* Attaché au Laboratoire de Zoologie (Arthropodes) du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris. Adresse: 61, Rue de Buffon, 75005, Paris, França.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour notre étude il nous a été possible d'examiner un important échantillonage de *O. cayaporum*: 66 exemplaires appartenant à la collection de l'Institut Butantan, 15 exemplaires de notre collection personelle et les deux exemplaires types, déposés aux collections du Muséum National d'Histoire naturelle, Paris.

Notre redescription est basée sur les deux exemplaires types, néanmoins, vu le mauvais état de préservation de ces deux exemplaires, l'analyse de la coloration se base sur des exemplaires plus récemment récoltés.

Les calculs statistiques sont faits selon Lamotte (1971).

MATÉRIEL ÉTUDIÉ:

IB = Institut Butantan.

MNHNP = Muséum National d'Histoire naturelle, Paris.

WL-OC = Collection Wilson Lourenço.

Brésil: Goiás: Araguacema, M. Montefelli col. III/1956, 1 femelle (IB-686), M. Montefelli col. III/1956, 1 mâle, 3 femelles (IB-687), M. Montefelli col. III/1956, 2 mâles, 2 femelles (IB-688); Colinas, W.R. Soares col. IV/1968, 1 mâle (IB-822), W.R. Soares col. IV/1968, 1 mâle (IB-971), W.R. Soares col. IV/1968, 1 mâle (IB-975). Pará: Baixo Araguaia (fl. amaz.), M. Lima col. X/1973, 1 mâle (IB-1012); Campos à l'ouest de la serra dos Cayapos, J. Vellard col. X/1929, 1 mâle, 1 femelle-types (MNHNP-RS-0264), W.R. Lourenço col. VI/1979, 7 mâles, 8 femelles (WL-OC-1 à 15); Conceição do Araguaia, Colég. Santa Rosa leg. X/1958, 2 mâles, 1 femelle (IB-685), ? col. XI/1959, 1 femelle (IB-764), Colég. Santa Rosa leg. X/1958, 1 mâle (IB-817), A.R. Hoge col. II/1964, 1 mâle, 9 femelles (IB-861), A.R. Hoge col. II/1964, 13 mâles, 9 femelles (IB-862), A.R. Hoge col. II/1964, 4 femelles (IB-875), A.R. Hoge col II/64, 5 mâles (IB-887), A.R. Hoge col. VIII/1965, 3 mâles, 3 femelles (IB-899), M.L. Borges col. VI/1967, 1 mâle (IB-963).

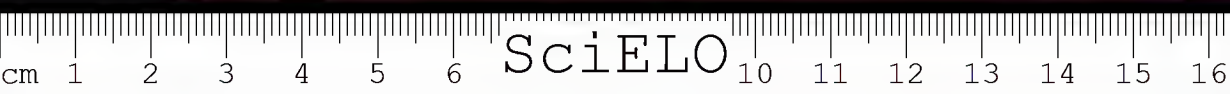
COMPLÉMENTS À LA DESCRIPTION D'*OPISTHACANTHUS CAYAPORUM* VELLARD, 1932

Opisthacanthus cayaporum Vellard, 1932, *Mém. Soc. zool. France*, *29*(6):540.

Opisthacanthus cayaporum: Mello-Leitão, 1945, *Arq. Mus. nac.*, *40*:27.

Holotype mâle (figs. 1 et 2).

RS-0264. Campos à l'ouest de la serra dos Cayapos, Pará, Brésil.

Coloration: La couleur de base est châtain-rougeâtre. Prosoma: plaque prosomienne de couleur châtain-foncé avec des zones plus claires le long du sillon interoculaire, derrière les yeux médians et sur les

Figs. 1 et 2 — Holotype mâle; vues dorsale et ventrale.

Figs. 3 et 4 — Allotype femelle; vues dorsale et ventrale.

bords latéro-postérieurs. Tubercule oculaire plus foncé, noirâtre. Mesosoma: tergites de même couleur que la plaque prosomienne, avec des zones plus claires, surtout sur la partie antérieure de chaque tergite à coté de la carène axiale. Metasoma avec les cinq anneaux de couleur châtain-rougeâtre-foncé; les zones plus claires forment des esquisses de tâches un peu estompées. Vésicule jaunâtre avec des taches longitudinales de couleur rougeâtre-foncé. Aiguillon à base jaunâtre et à extremité rougeâtre-foncé. Sternites jaune-rougeâtre; le VIIème plus foncé, rouge-noirâtre. Peignes et opercule-génital ocre-jaune-foncé, avec des tons grisâtres. Sternum, hanches et processus maxillaires, châtain-rougeâtre-foncé. Pattes châtain avec des zones plus claires jaune-rougeâtre qui forment des tâches en forme de trame. Pédipalpes châtain-rougeâtre-foncé avec des tons noirâtres; doigts presque noirs. Chélicères jaunâtres avec une trame noirâtre; les doigts sont rouge-noirâtre.

Morphologie: Front de la plaque prosomienne très profondément échancré. Tubercule oculaire plus ou moins au centre de la plaque prosomienne; yeux médians séparés par un peu plus qu'un diamètre oculaire. Trois yeux latéraux. Sillon interoculaire profond, s'allongeant jusqu'à l'arrière des yeux médians où il se divise en deux et entoure le début de la fossette triangulaire. Toute la plaque prosomienne est couverte d'une granulation plus ou moins grossière. Les sillons et la fossette triangulaire sont dépourvus de granules. Mesosoma: tergites finement granulés avec une granulation plus marquée dans la région postérieure. Carène axiale présente mais très peu marquée. Metasoma à anneaux arrondis; toutes les carènes sont peu marquées et formées de quelques granules grossiers et épars. Vème anneau à face ventrale pourvue de plusieurs granules en forme d'épines. Telson allongé; aiguillon proportionnellement très court; face dorsale pourvue d'une légère dépression dans la partie antérieure. Vésicule dépourvue de carènes. Peignes (fig. 5) avec 9-9 dents (voir tableaux II à V). Sternites lisses, à stigmates linéaires. Opercule génital fait de deux plaques à peu près triangulaires. Pédipalpes: fémur à 5 carènes, pourvues de granules très gros; tégument intercarénal des faces dorsale et ventrale très peu granulé, presque lisse; les autres faces un peu granulées. Tibia et pince avec une très forte granulation; ces grosses granulations forment quelques carènes très souvent incomplètes. Présence sur la face interne du tibia d'un grand éperon dans la région basale, avec 4 ou 5 granules à l'extremité. Pince grande et aplatie; face dorsale pourvue de quelques très fines granulations, chagrinée; faces latérales avec de grosses granulations; face ventrale brillante et réticulée. Doigts lisses à trichobothries fixées sur des plaques très brillantes et lisses, bien marquées; granulations digitales se disposant en deux lignes longitudinales (fig. 6); granules acessoires absents. Pattes: dernièr article avec deux rangées d'épines (figs. 7 et 8); les deux premières paires de pattes en général avec 4 internes et 2 externes; les deux dernières paires de pattes en général avec 4 internes et 2 externes; les deux dernières paires de pattes en général avec 5 internes et 3 externes. Le corps, les pattes, les pédipalpes et, plus spécialement la vésicule sont couverts de longues soies de couleur jaunâtre. Trichobothriotaxie: les figures 9 à 16 précisent le nombre et la disposition des trcihobothries des pédipaldes. Il est à remarquer la présence d'une troisième trichobothrie dans le territoire *esb*

LOURENÇO, W. R. Compléments à la description du Scorpion brésilien *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932 (Scorpiones· Scorpionidae). *Mem. Inst. Butantan.* 44/45:425-438, 1980/81.

sur la face externe du tibia (fig. 15). Hémispermatophore: les figures 17 et 18 montrent l'hémispermatophore gauche, vues externe et interne d'ensemble, où les différentes parties sont illustrées.

Allotype femelle (figs. 3 et 4).

RS-0264. Campos à l'ouest de la serra dos Cayapos, Pará, Brésil.

Seules les différences avec l'holotype mâle sont indiquées.

Coloration: semblable à celle du holotype mâle.

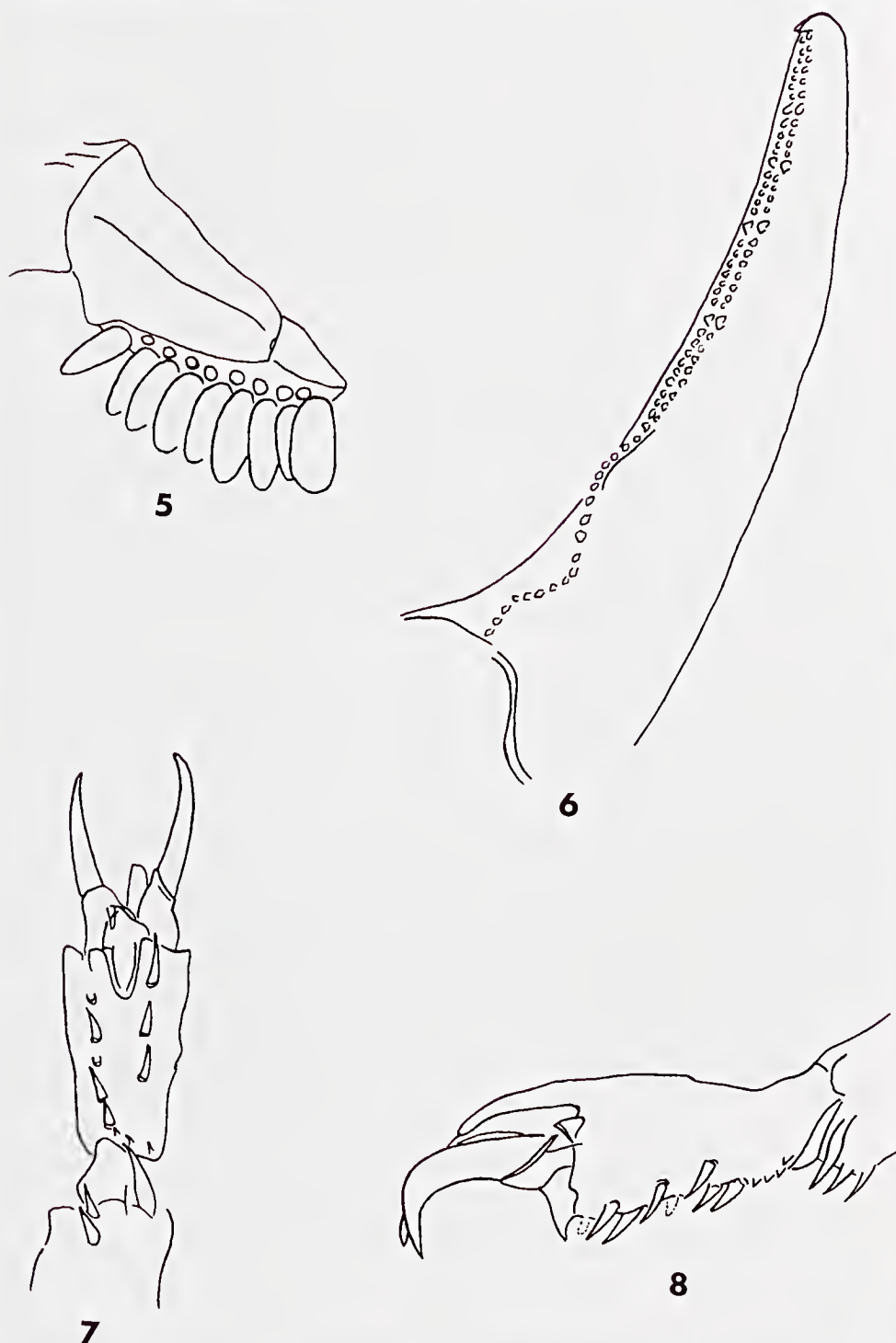
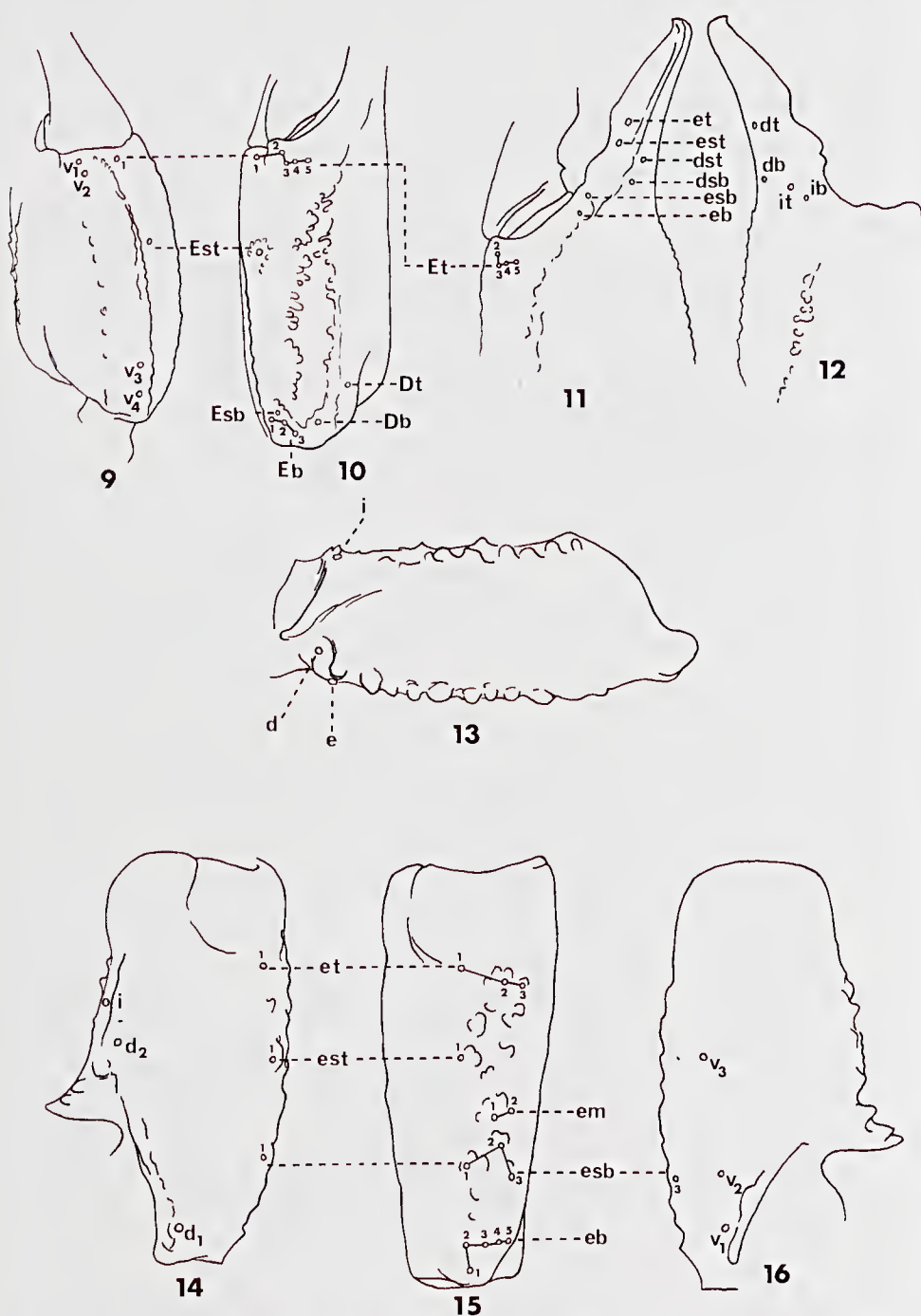
Morphologie: Plaque prosomienne avec les sillons plus marqués. Face dorsale de la vésicule avec dépression un peu moins marquée. Peignes avec 6-6 dents. Opercule-génital constitué d'une seule plaque non divisée, de forme plus ou moins pentagonal.

TABLEAU 1

Mensurations (en mm) des exemplaires décrits.

	Holotype-mâle	Allotype-femelle
Longueur totale	57,6	63,7
Prosoma-longueur	9,9	11,0
Prosoma-largeur antérieure	7,4	8,2
Prosoma-largeur postérieure	11,7	12,4
Mesosoma-longueur totale	18,1	20,9
Metasoma-longueur totale	29,6	31,8
Anneau caudal I-longueur	3,7	3,7
Anneau caudal I-largeur	3,4	3,4
Anneau caudal II-longueur	3,7	4,2
Anneau caudal II-largeur	2,9	3,1
Anneau caudal III-longueur	4,0	4,5
Anneau caudal III-largeur	2,6	2,9
Anneau caudal IV-longueur	4,5	5,0
Anneau caudal IV-largeur	2,2	2,5
Anneau caudal V-longueur	6,5	6,7
Anneau caudal V-largeur	2,2	2,4
Anneau caudal V-hauteur	2,5	2,7
Telson-longueur	7,2	7,7
Vésicule-longueur	5,9	6.2
Vésicule-largeur	2,4	2,6
Vésicule-hauteur	2,9	3,0
Aiguillon-longueur	1,3	1,5
Pédipalpe-longueur totale	38,1	42,0
Fémur-longueur	9,4	10,0
Fémur-largeur	3,6	4,2
Tibia-longueur	9,2	10,0
Tibia-largeur	5,1	5,9
Pince-longueur	19,5	22,0
Pince-largeur	7,4	8,2
Pince-hauteur	4,2	4,9
Doigt mobile-longueur	11,1	11,9

Remarque: bien que les exemplaires types soient vraisemblablement des adultes, il est possible de trouver dans la population étudiée des exemplaires bien plus grands.

LOURENÇO, W. R. Compléments à la description du Scorpion brésilien *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932 (Scorpiones· Scorpionidae). *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:425-438, 1980/81.

Figs. 5 à 8 — Holotype mâle. 5 — Peigne gauche. 6 — Doigt mobile droit. 7 et 8 — Telotarse, 3è patte droite.

Figs. 9 à 16 — Trichobothriotaxie (Holotype mâle). 9 — Pince gauche, vue ventrale. 10 — Pince gauche, vue externe. 11 — Pince gauche, vue dorsale. 12 — Pince gauche, vue interne. 13 — Fémur droit, vue dorsale. 14 — Tibia droit, vue dorsale. 15 — Tibia droit, vue externe. 16 — Tibia droit, vue ventrale.

LOURENÇO, W. R. Compléments à la description du Scorpion brésilien *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932 (Scorpiones· Scorpionidae). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:425-438, 1980/81.

VARIABILITÉ DU NOMBRE DE DENTS DES PEIGNES CHEZ *OPISTHACANTHUS CAYAPORUM*

Sigles utilisés: (Tableaux II-V).

nb = abréviation de nombre.
n = nombre de cas où le caractère étudié existe.
% = pourcentage déterminé par le rapport n/N.
Ic = intervalle de confiance correspondant à un pourcentage de fréquence à 95% de sécurité.
Fg = formule globale.

Remarques sur les caractères portés dans les tableaux II à V:

Pour les tableaux II et IV bien qu'on puisse remarquer l'existence d'un ou même deux cas de chevauchements des intervalles de confiance obtenus avec les pourcentages des fréquences des différents nombres de dénts, et cela entre les pourcentages les plus faibles, on peut admettre l'existence d'un nombre-type, 6 pour les femelles et 9 pour les mâles caractérisant les dents des peignes d'*Opisthacanthus cayaporum*. Cela doit confirmer, bien que les pourcentages soient inférieurs à 90%, l'impossibilité d'une prédominance d'autres nombres que 6 pour les femelles et 9 pour les mâles, dans tout échantillon pris au hasard dans cette même population.

Pour les tableaux III et V, compte tenu des chevauchements existant entre les intervalles de confiance obtenus avec les différents pourcentages de fréquences, on ne peut pas préciser une formule globale typique, soit pour les femelles, soit pour les mâles. Bien que ces valeurs typiques existent leur caractérisation sera possible uniquement après l'étude d'un échantillon beaucoup plus grand que celui actuellement étudié.

Les deux sexes ont un nombre de dents différent; on remarque l'inexistence totale des cas de chevauchement. Les différentes valeurs sont indiquées dans les tableaux II et IV et dans le graphique (fig. 19). Le calcul des moyennes donne: 5,7 pour les femelles et 9,3 pour les mâles; le calcul des variances donne respectivement 0,32 et (—0,115). Le test de comparaison des moyennes donne un coefficient *t* de Student de 73,47 assez significatif; les moyennes sont donc différentes sur le plan statistique. Le graphique exprime cette différence. Un tel résultat nous démontre donc que la distinction des sexes est parfaitement possible pour *O. cayaporum* à partir du nombre de dents des peignes et cela à tous les stades du développement.

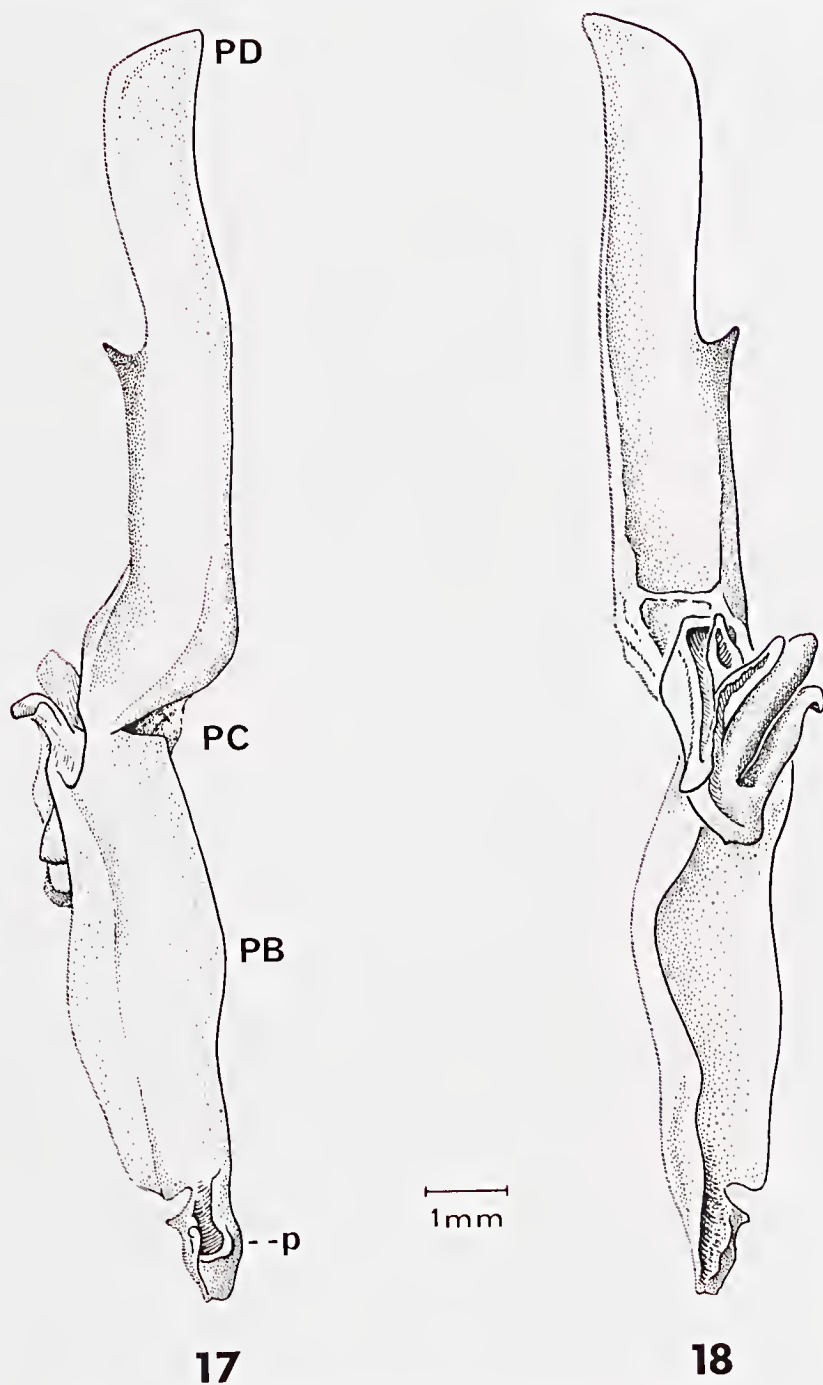
TABLEAU 2

Variations du nombre de dents des peignes (femelles)

nb dents	1dp	3dp	4dp	5dp	6dp	7dp
n	1	1	2	21	54	5
%	1,2	1,2	2,4	25,0	64,3	5,9
Ic	0,03-6,45	0,03-6,45	0,30-8,31	16,18-35,62	58,02-78,71	1,97-13,35

TABLEAU 3

Formules globales du nombre de dents des peignes (femelles)

Fg.	1-6	4-5 5-4 6-3	5-5	5-6 6-5	6-6	6-7 7-6	7-7
nb total	7dp	9dp	10dp	11dp	12dp	13dp	14dp
n	1	1 1 1 3	3	7 6 13	18	2 1 3	1
%	2,4	7,1	7,1	31,0	42,9	7,1	2,4
Ic	0,05- 12,52	1,50- 19,47	1,50- 19,47	17,64- 46,92	27,77- 58,85	1,50- 19,47	0,05- 12,52

s. 17 et 18 — Hémispermatophore gauche (IB-971). 17 — Vue externe. 18 — Vue interne. PD = partie distale. PC = partie centrale. PB = partie basale. P = pied.

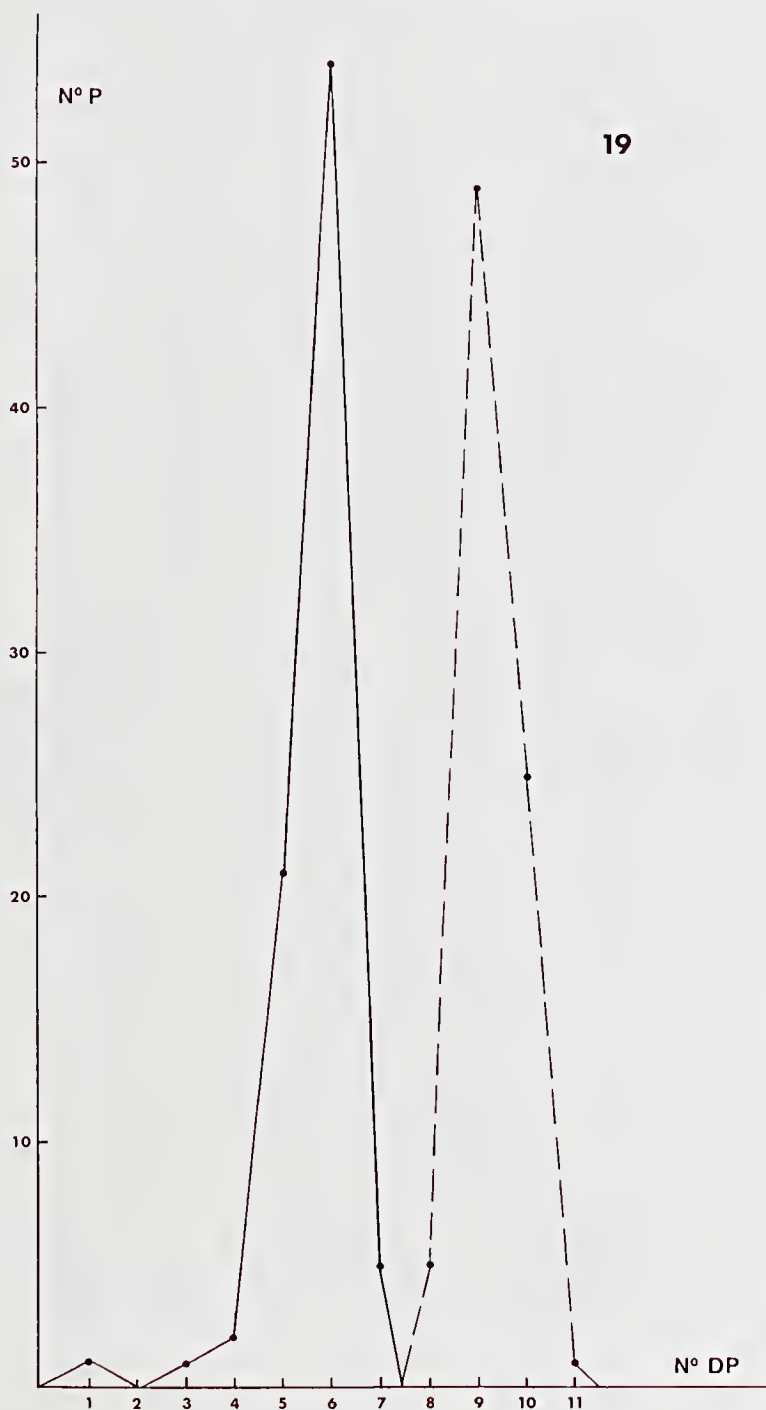



Fig. 19 — Distribution comparée des valeurs du nombre des dents des peignes, chez les mâles et les femelles d'*Opisthacanthus cayaporum*. N.ºP = nombre de peignes; N.ºDP = nombre de dents des peignes.

LOURENÇO, W. R. Compléments à la description du Scorpion brésilien *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932 (Scorpiones· Scorpionidae). *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:425-438, 1980/81.

TABLEAU 4

Variation du nombre de dents des peignes (mâles)

nb dents	8dp	9dp	10dp	11dp
n	5	49	25	1
%	6,2	61,3	31,3	1,2
Ic	2,10- 14,00	49,70- 71,90	21,30- 42,60	0,03- 6,80

TABLEAU 5

Formules globales du nombre de dents des peignes (mâles)

Fg.	9-8	8-10 9-9	9-10 10-9	10-10	11-10
nb total	17dp	18dp	19dp	20dp	21dp
n	4	1 17 18	7 4 11	6	1
%	10,0	45,0	27,5	15,0	2,5
Ic	2,80- 23,70	29,30- 61,40	14,60- 43,90	5,70- 29,80	0,06- 13,10

REMERCIEMENTS

Nous remercions ici bien vivement Sylvia Lucas et Vera R.D. von Eickstedt de l'Institut Butantan pour le prêt du matériel d'*Opisthacanthus cayaporum*. M.Gaillard et J.Rebière pour la réalisation des dessins et des photos. Annie Prieur pour la mise en forme du texte et M. le Pr. M. Vachon pour la lecture critique de ce travail.

ABSTRACT: This paper is a contribution to the taxonomical knowledge of *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932. This species is redescribed based on the two type-specimens and also on 81 specimens collected in the states of Pará and Goiás in Brazil. The variability of some characters as the number of teeth of the pectines is analysed and disposed in tables. *O. cayoporum* shows a very important sexual difference for this character, therefore, males and females, even immature forms, can be distinguish through this criterion.

KEY-WORDS: *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932; Scorpionidae.

LOURENÇO, W. R. Compléments à la description du Scorpion brésilien *Opisthacanthus cayaporum* Vellard, 1932 (Scorpiones· Scorpionidae). *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:425-438, 1980/81.

BIBLIOGRAPHIE CITÉE

1. LAMOTTE, M. *Initiation aux méthodes statistiques en biologie.* Paris, Masson et Cie. Edit., 1971. 2 ème edit., 144 p.

2. MELLO-LEITÃO, C. Escorpiões sul-americanos. *Arq. Mus. nac., 40*:1-468, 1945.

3. VELLARD, J. Scorpions. *In: Mission scientific au Goiaz ct au Rio Araguaya. Mém. zool. France, 29*(6):539-556, 1932.

Mem. Inst. Butantan
44/45:439-449, 1980/81

THE WITHANOLIDES AS A MODEL IN PLANT GENETICS: CHEMISTRY, BIOSYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY *

David LAVIE **

ABSTRACT: The withanolides are oxygenated steroidal lactones occurring in a number of species of the Solanaceae plant family. In *Withania somnifera* (L.) Dun., which has a fairly wide geographical distribution, several chemotypes have been identified. They differ primarily in their respective composition in withanolides displaying a variety of substitution patterns.

Through hybridization performed between different types originating from various parts of the world, followed by chemical analysis of the constituents present in the offsprings, genetic characters were identified at the chemical level. Several hybrids were chemically analysed and thereby a study of the inheritance characteristics of a number of chemical groups was made possible. Biosynthetic pathway are suggested based on the occurrence of appropriate intermediates. A summary of the biological activity is provided.

KEY-WORDS: Withanolides: chemistry, biosynthesis, biological activity.

INTRODUCTION

Withania somnifera (L.) Dun. is a shrub of the Solanaceae plant family, with a fairly wide geographical distribution. In Israel it grows at least as three distinct chemotypes differing in their leaf content of the various withanolides, C-28 oxygenated steroidal lactones with various substitution patterns.[1] Chemotypes are considered as groups of plants which morphologically are similar in all respects, however, differ by their chemical constituents; in the present case through the composition of the withanolides in the leaves, and the respective quantities.

In this paper we will discus the constituents of a number of chemotypes, describe some highlights of their structures, analyse and discuss

* Presented at the Seminar on Bioactive Natural Products, São Paulo, 20-22 May, 1981, in commemoration of the 80th Anniversary of the foundation of the Institute Butantan.

** Department of Organic Chemistry — The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

the composition and substitution pattern of the compounds formed in the hybrids obtained by the cross pollination between different chemotypes.

This approach enabled an understanding of the inheritance at the chemical level, and led to the disclosure of biosynthetic pathways. It could provide a certain control of the formation of specific compounds in the plant.

It is interesting to note that other genera of this family (Solanaceae) as Physalis, Acnistus, Jaborosa, and Nicandra, also produced withanolides and related structures which showed certain skeletal alterations. [2]

A number of withanolides were found to have antineoplastic activity and immunosuppressive properties. [3]

RESULTS AND DISCUSSION

The compounds found in chemotype I have been described in an earlier publication. [4] Withaferin A (*1*) is always the major product which is formed, whereas the others, *2-5*, are obtained in small quantities. Chart 1 shows some of the compounds present in this type. It could be seen that OH groups are present in various positions of the carbon skeleton, however, no such group could be found at position C-20 of the side chain. In rings A/B the 4β-OH, 5β, 6β-epoxy system is observed in most compounds and is present in the product formed in the largest quantity, withaferin A (1). This system is a predominant feature of the compounds of this type. [5]

The compounds identified in chemotype II (Chart 2) have all an OH group at position C-20, a feature inherent to the compounds of this group. [4, 5] Here again the 4β-OH,5β,6β-epoxy system is present in most cases. The compound which accumulates and is present in the largest quantity is withanolide D (*6*). It forms 88% of the total withanolide content of the leaves, whereas the others are formed by far in smaller quantities.

In chemotype III several compounds have been isolated, some of which are presented in Chart 3. [6, 7] Two groups of compounds have been identified, those having an isolated double bond in ring B, in addition to the usual 2-en-1-one system of all the whithanolides; these compounds in most cases have a 14α-OH group, recently identified in all of them [7] together with the usual β-oriented lactone side chain. The second group is represented by withanolide E (*13*) in which the side chain is α-oriented. [8, 9] This inverted stereochemistry is a unique feature in a naturally occurring steroid, and was found so far only in this group of compounds. In all the products existing in chemotype III, no 4β-OH has been detected. Only in withanolide E (*13*) is an epoxide present at position 5,6 of ring B.

The above observations led to the idea that the formation of the different compounds, with their inherent characteristics concerning the substitution patterns, is produced by specific enzymatic reactions genetically controlled. Therefore, it was interesting to see how genetic mani-

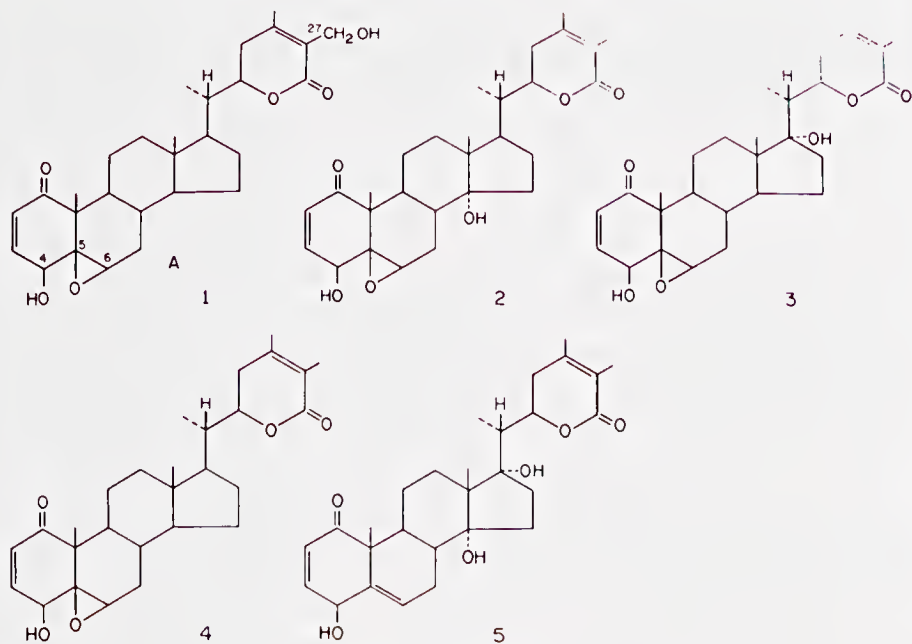



Chart 1 Chemotype I

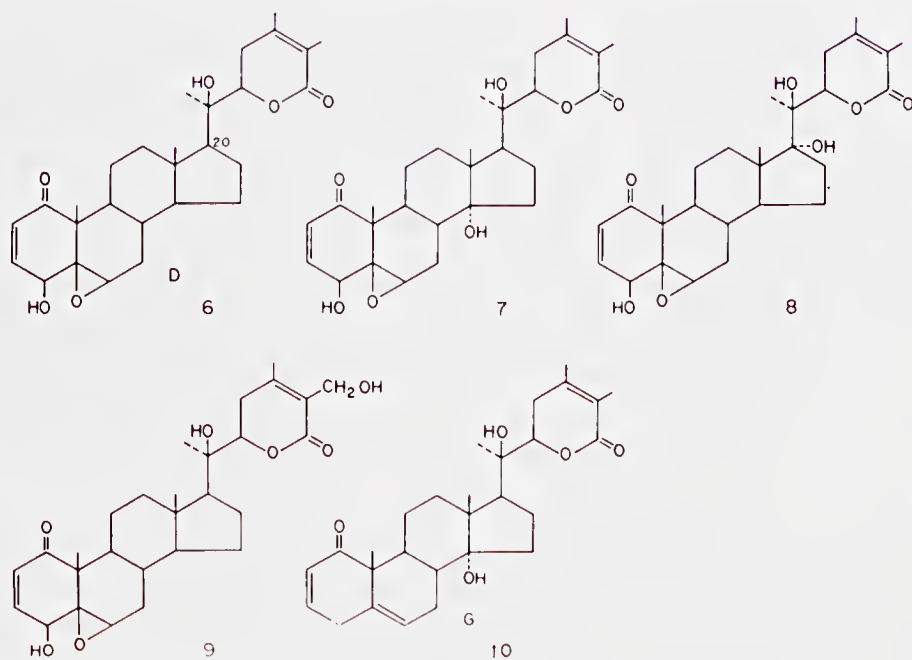



Chart 2 Chemotype II

pulation by cross pollinations between the types, would act on the formation of the compounds in the offsprings. Analysis of the constituents of the first generations (F_1) was carried out. [5]

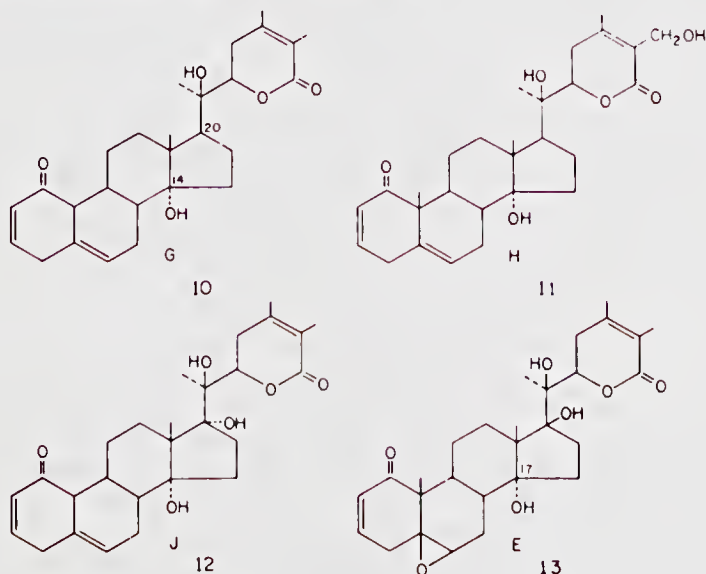



Chart 3 Chemotype III

The reciprocal crosses for example of chemotypes IxIII gave hybrids which showed in the leaves a large accumulation of withanolide D (*6*). The compound, however, was never detected in both parents, chemotypes I or III, but it was the major constituent of chemotype II. The hybrid which was formed was not identical with type II as it could be seen in the finger-print of the chromatoplates for both plants; the set of spots seen in each of the respective extracts not being identical throughout the path of the plates. For example, a spot assigned to withanolide E (*13*) was present in the hybrid and obviously inherited from chemotype III, but was missing among the spots of chemotype II. Furthermore, withaferin A (*1*), the major constituent of chemotype I could not be detected in these offsprings, whereas the compound E (*13*) was present in much smaller quantities than in the parent type III. Clearly, through the pool of genes following the cross, different characters were combined, producing new combinations of substituents in the products.

The cross of IxII produced again primarily withanolide D (*6*), whereas IIxIII produced a mixture having the same compound D (*6*) as predominant, together with compound E (*13*) (α side chain) being present in this hybrid. [5] The results clearly indicated that the enzymatic systems producing compound D (*6*) and involving the reactions introducing the 20-OH and the 4β-OH,5β,6β-epoxy system were present, and have to be dominant factors in the genetic pool.

LAVIE, D. The withanolides as a model in plant genetics: chemistry, biosynthesis and biological activity. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:439-449, 1980/81.

In order to analyse in a better way and clarify these factors, the second generation F_2 of the cross IxIII was studied. Some 45 seedlings of this F_2 generation were raised from seeds obtained from self pollinated flowers, and were analysed separately for their constituents using rapid methods of identification: chromatoplates for finger printing or small chromatographic columns for purification of the components, applying NMR and mass spectrometry for identification.

Substituents at various locations of the carbon skeleton were then selected for detailed analysis and their presence in the molecules counted, i.e. the count was done on the presence of a given substituent in the major compounds found in each plant. The results are shown in Table 1 and are as follows: the presence of a 4β-OH group is recorded in 30+6 cases against 5+4 times when an unsubstituted H atom will be present. A 5β, 6β-epoxide will be present the same number of times against an unreacted double bond (Δ^5) again in 5+4 times. Each number referring to a different compound present in the individual plants.

In position C-14 in 30+6 cases, an H will be present whereas in 5+4 cases an α-OH will be observed. For the 20-OH group the numbers are 30+5 present against 6+4 absent, and at C-27 a hydroxy-group will be present only in 6+4 cases against 30+5 times when the $-CH_3$ group will not be oxidized.

The relation between occurrence and absence of groupings in the selected positions is 1:3.5 to 1:4, a relation fitting very well into the genetic inheritance rules, and since we observe the products of enzymatic reactions taking place in the cells which are controlled by genetic characters, one can refer to these characters as *dominant* or *recessive* while being observed this time at the *molecular level*. Therefore the introduction of the 4β-OH with a 5β, 6β-epoxy system is a dominant character as is the introduction of the 20-OH, whereas the 27-OH as well as the 14α-OH are due to recessive characters as indicated in Table 1.

TABLE 1

Occurrence of different groups in the F_2 generation of the cross of chemotypes IxIII in 45 single plants

Position	Number of cases				Characters	
	30	6	5	4	Dominant	Recessive
4β	OH	OH	H	H	OH	H
5-6	epoxide	epoxide	Δ^5	Δ^5	epoxide	Δ^5
14α	H	H	OH	OH	H	OH
20	OH	H	OH	H	OH	H
27	CH_3	CH_2OH	CH_3	CH_2OH	CH_3	CH_2OH

In our collection of *W. somnifera* plants grown in our experimental plots, we had samples originating from India, they were named Indian I (Delhi) on the basis of the location from where the seeds were collected. When analysed carefully, a large number of withanolides of the most va-

LAVIE, D. The withanolides as a model in plant genetics: chemistry, biosynthesis and biological activity. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:439-449, 1980/81.

ried nature were isolated and identified [10]. Chart 4 shows some representative structures indicating that the outstanding feature in this chemotype is the appearance of a different and characteristic substitution pattern in rings A and B, namely the 5α-OH, 6α, 7α-epoxy system as observed in withanone * (14). This compound has also a 17α-OH. Withaferin (1) was also found to be present in this type in sizable quantities so that the plant has the outstanding ability of producing concurrently the two systems in rings A/B, the 5α-OH, 6α, 7α-epoxy, and the 4β-OH, 5β, 6β-epoxide. Advantage was taken of this characteristic in our subsequent genetic studies and cross-breedings. The most interesting feature inherent to this plant was, however, the fact that at position C-20 in *all* compounds no OH group was ever found to be present [10].

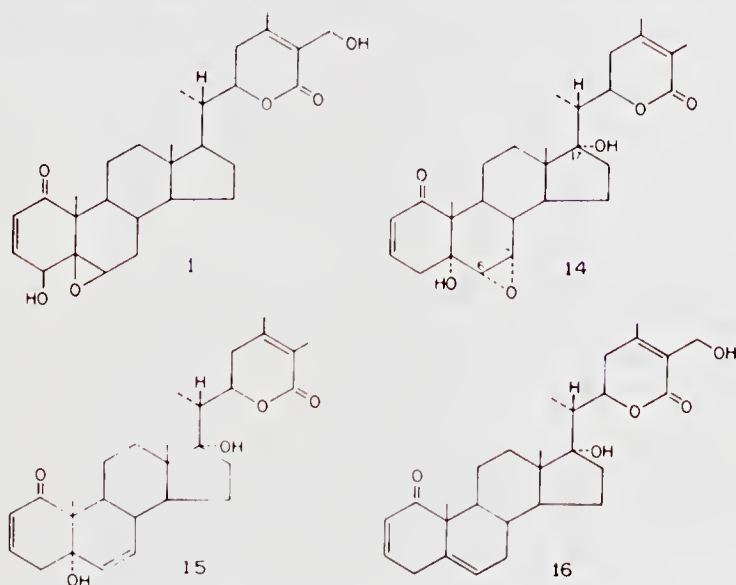



Chart 4 Chemotype Indian I

Following the hybridization of Indian I by chemotype III offsprings were obtained in which withanolide D (6) was formed replacing withaferin A (1) which disappeared from the mixture, i.e., a compound with a 20-OH, dominant character, instead of the recessive 27-OH. Furthermore, a new "non natural" withanolide was produced, withanolide T (17), which is a 20-OH withanone, a compound that the plant Indian I was unable to prepare. Such a compound was the product of the new enzymatic changes originating from the genetic pool of the hybrid [11].

Recently the analysis of the cross of chemotypes III by Indian I was repeated [12]. Also a study of the hybrid of chemotypes II by Indian I was carried out [12]. Table 2 provides the compounds isolated from these two F_1 hybrids given in percent of the respective total withanolide con-

* Withanone is the name given to a compound isolated from plants collected in India, and first identified as compound IV in Ref. 10. This name is now adopted.

LAVIE, D. The withanolides as a model in plant genetics: chemistry, biosynthesis and biological activity. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:439-449, 1980/81.

TABLE 2

Withanolides given as percent relative to their total occurrence

Compound	Chemotypes			Hybrids	
	Ind.I * 10	II * 4	III * 6	II x Ind. I	III x Ind. I
Withanolide G (10)			3.9	1.0	8.0
Withanolide I			0.4		2.4
Withanolide J (12)			2.6		0.4
Withanolide U					2.4
Withanolide E (13)			91.9		
Withaferin A (1)	33.4				
Withanolide D (6)		88.0		62.0	49.4
14-Hydroxy-20-desoxywithanolide D	0.9				
27-Hydroxy-withanolide D (9)		10.7		2.5	
Withanone (14)	58.0			18.6	16.7
20-Hydroxy-17-desoxywithanone (18)				3.6	6.3
Withanolide T (17)				8.3	9.6
14α-Hydroxy withanone					0.3
14β-Hydroxy withanone				4.1	2.1
6,7-Desoxy withanone (15)	0.9				

* The values are computed on the basis of the reported data.

tent. The data of the relevant parents are also incorporated. Table 3 provides the combined quantitative occurrence of each substituent in relation as percent of the total withanolide content, each being treated as a separate item.

TABLE 3

Calculated occurrence in percent of each substitution in relation to the total withanolide content

Substituents	III (Isr.) x Ind. I	III (Isr.)	Indian I	II (Isr.)	II (Isr.) x Ind. I
4β-OH	51	—	35	99	64
5β,6β-Epoxide	49	92	35	99	64
20-OH	78	100	—	99	77
14α-OH	13	99	1	1	1
17α-OH	27	3	64	0.5	31

From the cross breedings described above, we know that three substituents are introduced due to dominant factors, those are the $20\alpha_F$-OH, the 4β-OH and the 5β, 6β-epoxide. One can see that if theoretically each of these substituents should occur as 75% of the mixture, due to the dominant character, for the first (in II by Indian I), we have

recorded 78%, for the second 51% and for the third 49%. The lower values for the last two positions are due to the fact that there is in this case a competition with other enzymes, those producing the 5α-OH and 6α, 7α-epoxide, characteristic of the withanone system (14) present in the Indian I chemotype. The 14α-OH and 17α-OH are both due to recessive characters and instead of the expected 25% the observed quantities are 13% for the former and 27% for the latter. The lower value of 13% may be attributed to some interference by the 17α-OH. Also some 14α-OH may have been converted to 14β-OH derivatives through formation of a Δ^{14} followed by reoxidation as described earlier.[12, 13]

Concerning the hybrid II by Indian I,[12] similar conclusions can be drawn. The 20-OH appeared in 77%, the 4β-OH and 5β, 6β-epoxide in 64% each, again in lower values due to competition with the withanome (14) rings A/B system. The 14α-OH is missing, or occurring in trace quantities in the two parents and so in their hybrid (1%), whereas the 17α-OH is present in a normal level 31%.

Analysis of a hybrid derived from the cross of chemotype II (Chart 2) with a type originating from South Africa,[14] Chart 6, grown in our plots, indicated that the dominant characters present in both parent, namely 4β-OH and 5β, 6β-epoxide prevailed (100%). Concerning the 20-OH group present only to the extent of 10% in the African parent,[15] it must be due to a different enzyme than the one encountered in all other cases, and known to be connected with a dominant character. Indeed, following the cross with chemotype II, 95% of this group was produced in the compounds.

The double bond reducing capacity (specific to this type) which was present in the South African parent[15] to a small extent, 5.8% for the 24,25-dihydro compounds (20, 21) should be considered as a recessive character. Following cross with chemotype II it reached the expected level of 27.5%. Interestingly, this character expressed itself also by reducing the 2,3-double bond only in the hybrids and to the extent of 22.4% (Table 4).

Table 4 provides the occurrence in percent of various substitutions in chemotypes II (Israel) and the South African, and in the product of their cross; it sums up some of the remarks provided above.

TABLE 4

Calculated occurrence in percent of substituents in *W. somnifera* chemotypes South African, II (Isr.) and their cross

Substituents	South African (%)	II (Israel) (%)	Cross (%)
4β-OH	100	99.6	100
Δ^5	—	0.3	—
5β, 6β-Epoxide	100	99.6	100
$20\alpha_F$-OH	10.5	99.0	95.0
24,25-Dihydro	5.8	—	27.5
2,3-Dihydro	—	—	22.4
2-Ene-1,4-dione	—	—	2.8

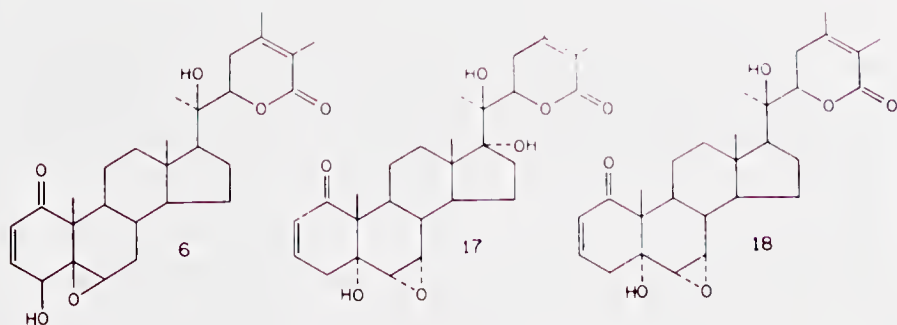



Chart 5 Hybrid of Indian I by Chemotype II

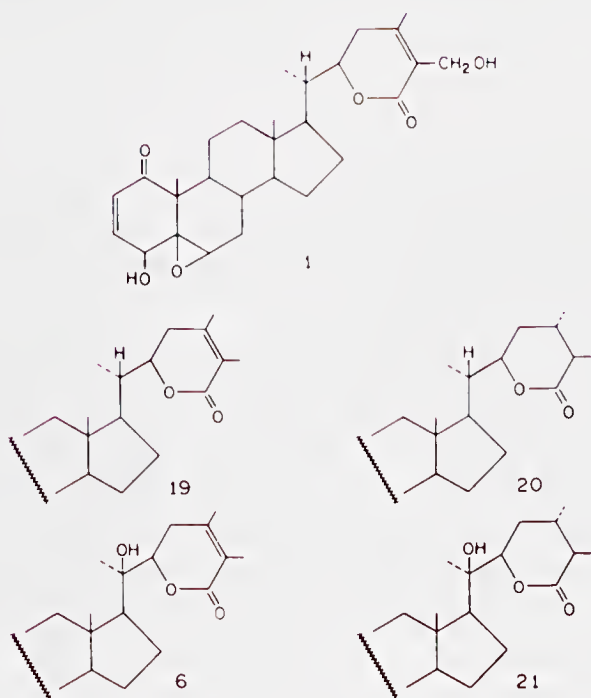



Chart 6 South African Chemotype

BIOLOGICAL ACTIVITY

Withaferin A (1) was found to be active on a number of tumor systems in mice [16]. It will also produce mitotic arrest in the metaphase of the tumor system [17, 18]. In experiments with Ehrlich ascites in which the tumor growth had disappeared, the mice were resistant to rechallenge with the ascitic tumor cells. Such a behaviour was explained as a combined effect of the compound (1) and an immune response [17].

Withanolide E (13) has been tested on several tumor systems used in cancer chemotherapy screening, and a number have responded with this compound. P388 leukemia bearing mice survived by 48% to the controls, but it was most active on B-16 mouse melanoma (70%) and Lewis lung carcinoma (unpublished results).

The immunosuppressive effects of the two compounds (1) and (13) were tested on a number of systems [3]. Four tests were performed with human T and B lymphocytes since the main interest was the mode of action of these compounds on the human immune system. Both compounds showed an effect on E and C_3 human lymphocytes receptors, withanolide E (13) affecting more the human lymphocyte E receptor (T cells), while withaferin A (1) had a stronger action on C_3 receptors (B cells).

The inhibitory effects of both compounds on the local graft versus host reaction demonstrate that they had also an effect on the functional activity of T cells, again withanolide E showing a stronger action than withaferin A [3]. Further studies are under course.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Mr. Albert Bildner, São Paulo and New York, whose financial assistance enabled the presentation of this research work in São Paulo, and the "Serviço de Química Orgânica" of the Instituto Butantan, which sponsored this lecture.

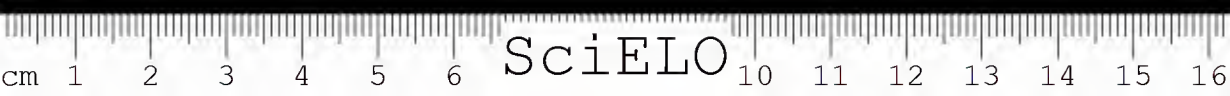
RESUMO: Os withanolídeos são lactonas esteroídicas que ocorrem em espécime da família das Solanaceas. Diversos quimiotipos foram identificados em *Withania somnifera* (L.) Dun., espécie de ampla distribuição geográfica e apresentam diferenças principalmente nas suas respectivas composições em withanolídeos que possuem uma variedade de substituintes. Através de hibridização efetuada entre tipos diferentes oriundos de várias áreas do globo, seguida por análises químicas dos componentes presentes nas mudas, conseguiu-se evidenciar as características genéticas ao nível químico. Assim sendo, diversos híbridos foram quimicamente analisados, tornando possível um estudo dos caracteres de transmissão genética dos grupos químicos. Vias biossintéticas são sugeridas com base na presença dos intermediários apropriados. Um resumo das atividades biológicas é apresentado.

UNITERMOS: Withanolides, *Withania somnifera*, Solanaceae, lactonas esteroídicas, fitogenética.

UNITERMS: Withanolides, *Withania somnifera*, Solanaceae, steroidal lactones, plant genetics.

LAVIE, D. The withanolides as a model in plant genetics: chemistry, biosynthesis and biological activity. *Mem. Inst. Butantan, 44/45*:439-449, 1980/81.

REFERENCES

1. ABRAHAM, A.; KIRSON, I.; GLOTTER, E. & LAVIE, D. A chemotaxonomic study of *Withania somnifera* (L.) Dun. *Phytochemistry, 7*:957, 1968.
2. GLOTTER, E.; KIRSON, I.; LAVIE, D. & ABRAHAM, A. The Withanolides — A group of natural steroids. *Bioorganio Chemistry*, van Tamelen, E.E. Ed.; Vol. II, pp. 57-95, Academic Press Inc., New York, 1978.
3. SHOHAT, B.; KIRSON, I. & LAVIE, D. Immunosuppressive activity of two plant steroidal lactones, Withaferin A and Withanolide E. *Biomedicine, 28*:18, 1978.
4. ABRAHAM, A.; KIRSON, I.; LAVIE, D. & GLOTTER, E. The withanolides of *Withania somnifera* chemotypes I and II. *Phytochemistry, 14*:189, 1975.
5. LAVIE, D.; KIRSON, I. & ABRAHAM, A. Chemical approach to genetics. *Isr. J. Chem., 14*:60, 1975.
6. GLOTTER, E.; KIRSON, I.; ABRAHAM, A. & LAVIE, D. Constituents of *Withania somnifera* Dun. — XIII. The withanolides of chemotype III. *Tetrahedron, 29*:1353, 1973.
7. KIRSON, I. & GOTTLIEB, H.E. 14 α-hydroxysteroids from *Withania somnifera* (L.) Dun. (Solanaceae). *J. Chem. Res.* (S) 338; (M) 4275, 1980.
8. LAVIE, D.; KIRSON, I.; GLOTTER, E.; RABINOVICH, D. & SHAKKED, Z. Crystal and molecular structure of withanolide E, a new natural steroidal lactone with a 17 α-side chain. *J.C.S. Chem. Commun.*, 877, 1972.
9. GLOTTER, E.; ABRAHAM, A.; GUNZBERG, G. & KIRSON, I. Naturally occurring steroidal lactone with a 17 α-oriented side chain. Structure of withanolide E and related compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* I, 341, 1977.
10. KIRSON, I.; GLOTTER, E.; LAVIE, D. & ABRAHAM, A. Constituents of *Withania somnifera* Dun. — Part XII The withanolides of an Indian chemotype. *J. Chem. Soc.* (C), 2032, 1971.
11. KIRSON, I.; ABRAHAM, A. & LAVIE, D. Chemical analysis of hybrids of *Withania somnifera* L. (Dun.). 1 — Chemotypes III (Israel) by Indian I (Delhi), *Isr. J. Chem., 16*:20, 1977.
12. NITTALA, S.S. & LAVIE, D. *Phytochemistry*, in press, 1981.
13. NITTALA, S.S.; FROLOW, F. & LAVIE, D. Novel occurrence of 14 β-hydroxy group on a withanolide skeleton; X-Ray crystal and molecular structure of 14 β-hydroxywithanone. *Chem. Commun.*, 178, 1981.
14. EASTWOOD, F.W.; KIRSON, I.; LAVIE, D. & ABRAHAM, A. New withanolides from a cross of a South African chemotype by chemotype II (Israel) in *Withania somnifera* L. (Dun.), *Phytochemistry, 19*:1503, 1980.
15. KIRSON, I.; GLOTTER, E.; ABRAHAM, A. & LAVIE, D. Constituents of *Withania somnifera* Dun. — XI. The structure of three new withanolides, *Tetrahedron, 26*:2209, 1970.
16. SHOHAT, B.; GITTER, S. & LAVIE, D. Effect of withaferin A on Ehrlich Ascites tumor cells. Cytological observations. *Int. J. Cancer, 5*:244, 1970.
17. SHOHAT, B., Effect of Withaferin A on cells in tissue culture. *Z. Krebsforsch., 80*:97, 1973.
18. SHOHAT, B.; BEN-BASSAT, M.; SHALTIEL, A. & JOSHUA, H. The effect of Withaferin A on human peripheral blood lymphocytes: an electron-microscope study. *Canecr letters, 2*:63, 1976.

Mem. Inst. Butantan
44/45:451-462, 1980/81

STUDIES OF BRAZILIAN MARINE INVERTEBRATES. IX *. COMPARATIVE STUDY OF ZOANTHID STEROLS 1. THE GENUS *ZOANTHUS*

A. KELECOM **
A.M. SOLÉ CAVA **

ABSTRACT: The sterol composition of two *Zoanthus* species has been analysed and compared with literature data. The new marine sterol zoanthosterol (4α-methyl-5α-ergosta-24(28)-en-3β-ol) has been obtained from *Z. sociatus*. Biological implications are discussed.

KEYWORDS: Zoanthids *, *Zoanthus* species, *Zoanthus sociatus*, sterol composition *, cholesterol, chalinasterol, brassicasterol, zoanthosterol *, zooxanthella.

INTRODUCTION

The increased interest in marine sterols has led to the identification, during the last 15 years, of a number of new structures obtained principally from Molluscs, Echinoderms, Poriferas and Coelenterates mostly of the class Anthozoa, *i.e.* Octocorallia and Hexacorallia (15). Whilst Octocorals (soft corals and sea fans) have been intensively investigated yielding more than 40 new sterols (15), little attention has been payed, in comparison, to sterols from Hexacorals (hermatypic corals, sea anemones and zoanthids) (8). This is not surprising for corals and sea anemones for which a generous part of the wet weight is inorganic matter (corals) or water (some sea anemones). In contrast, zoanthids yield large proportions of extractable organic material. Even so, zoanthid sterols have been much less studied than the coral or sea anemone ones (8). The rather confused biological systematics of Zoanthids, at species level, is probably responsible, in part, for this situation (10, 19). Indeed, after CARLGREN (7), "everyone examining the Zoantharia has learnt how difficult it is to determine the members of this group of Anthozoans".

---

* Presented at the Seminar on Bioactive Natural Products, São Paulo, 20-22 May, 1981. Previous paper in this series, see reference 12.

** Laboratórios Silva Araújo Roussel S.A. — Unidade de Pesquisas — Rua do Rocha, 155 — CEP 20960 — Rio de Janeiro-RJ — BRASIL.

KELECOM, A. & SOLÉ CAVA, A. M. Studies of brazilian marine invertebrates. IX*. Comparative study of Zoanthid sterols 1. The genus *Zoanthus*. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:451-462, 1980/81.

The order Zoanthidea is composed of three families and eleven genera for a total of about 260-270 different species (see Table 1). The family Zoanthidae is the main one and is restricted to tropical seas (10). From the 39 species recorded for the West Indies and for the Atlantic coast of South America, 29 belong to the family Zoanthidae; among them, 10 are of the genus *Zoanthus* and 13 (or 18*) of the genus *Palythoa*. This comparative study will be restricted to species of the family Zoanthidae.

The present work deals with the sterol composition of two Brazilian zoanthids of the genus *Zoanthus*. In the second paper of this series we will consider the genus *Palythoa*. Comparison with literature data and biological implications are discussed.

TABLE 1

The order ZOANTHIDEA after HERBERTS and WALSH (10, 19)

FAMILY	Genus	known species		West Indies South America
Zoanthidae	*Isaurus* Gray	5	64%	1
	Spenopus Steenstrup	1		0
	Zoanthus Lamarck	59		10
	Palythoa Lamouroux	93		13
	Gemmaria Duch. & Mich. / *Protopalythoa* Verrill	10		5
Epizoanthidae	*Epizoanthus* Gray	53	21%	4
	Thoracactis Gravier	1		0
Parazoanthidae	*Gerardia* Bertholani	1	15%	0
	Isozoanthus Carlgren	14		0
	Parazoanthus Haddon & Shackleton	25		6

MATERIAL AND METHODS

Equipment: melting points were determined on a BUCHI SMP-20 apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on a PERKIN-ELMER 241 polarimeter at 25.° in $CHCl_3$. Low resolution mass spectra were determined on a MICROMASS MM12F instrument. IR spectra were recorded in $CHCl_3$ solutions with a PERKIN-ELMER 735B spectrophotometer. GC analysis were performed on a VARIAN 2440 apparatus equipped with a FID system and on a 3% OV-17 on VARAPORT 30 column (7'x1/8") operating in isotherm mode at 285.°. Retention times are expressed relatively to cholesterol. Column chromatographies were carried out on E. MERCK Kieselgel 60 (70-230 mesh). Analytical and preparative thin layer chromatographies (tlc) were carried out on E. MERCK Kieselgel 60 F254 ready-to-use plates, the

* It is uncertain whether the genera *Gemmaria* and *Protopalythoa* are different from one another and whether they should be included into the genus *Palythoa* (19).

chromatograms being revealed by spraying a 3% ethanolic solution of phosphomolybdic acid followed by heating at 150.°.

Animals: fresh polyps of *Zoanthus sociatus* (Ellis, 1767) (Hexacorallia, Zoanthidea) and of an unidentified *Zoanthus* species were collected, on rocky bottom, along the coast of the state of Rio de Janeiro. They were preserved in 70% EtOH until work up. Data about the collection appear in Table 2.

TABLE 2

The *Zoanthus* collection

Animal	Local	Date	Depth	Yield % extract
Zoanthus sp	Ilha Grande	15-03-80	1 — 2 m	18.3
Z. sociatus	Cabo Frio	29-05-80	0 — 1 m	10.5

Zoanthus sp: as sterile colonies

Z. sociatus: as sterile or hermaphrodite colonies

Extraction: the aqueous ethanol in which the animals were preserved was filtered off, and the animals extracted several times with ethanol until a colorless extract was obtained. The polyps were then extracted with methylene chloride. The organic extracts were combined and evaporated under reduced pressure. Water was eliminated by azeotropic distillation with benzene. The extract was then triturated in methylene chloride to eliminate inorganic matter. Evaporation of the solvent afforded a methylene chloride residue from which the sterol fraction was isolated.

Obtention of the sterol mixtures — Isolation of the sterols:

a) The obtention, from *Zoanthus sociatus*, of the free monohydroxy sterol mixture and the separation of the sterols as their acetyl derivatives have been described earlier (12). The physico-chemical data of compounds Z-1, Z-2 and Z-3 (see figure 1.ª) have been reported for the acetyl derivatives in cited reference.

b) Identical techniques have been used in the case of the unidentified *Zoanthus* species.

MS of the sterol mixture from *Zoanthus* sp: molecular ion at m/e = 414 (2, $C_{29}H_{50}O$) — 400 (7, $C_{28}H_{48}O$) — 398 (42, $C_{28}H_{46}O$) — 386 (28, $C_{27}H_{46}O$) and 384 (8, $C_{27}H_{44}O$); characteristic fragment ions at m/e = 399 (13, 414 — CH_3), 396 (1, 414 — H_2O), 385 (4, 400 — CH_3), 383 (6, 398 — CH_3), 382 (2.5, 400 — H_2O), 381 (2, 414 — CH_3, H_2O), 380 (4, 398 — H_2O), 371 (8, 386 — CH_3), 369 (4, 383 — CH_3), 368 (11, 386 — H_2O), 367 (2, 400 — CH_3, H_2O), 365 (4, 398 — CH_3, H_2O), 355 (3.5), 353 (8, 386 — CH_3, H_2O), 351 (1, 384 — CH_3, H_2O), 336 (7), 314 (13, 398 — C_6H_{12}, *i.e.* Mac Lafferty rearrangement from a $\Delta^{24(28)}$ double bond), 300 (28), 299 (7, 314 — CH_3), 296 (2, 314 — H_2O), 275 (13), 273 (17), 271 (30), 255 (42), 213 (22), ...

KELECOM, A. & SOLÉ CAVA, A. M. Studies of brazilian marine invertebrates. IX*. Comparative study of Zoanthid sterols 1. The genus *Zoanthus*. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:451-462, 1980/81.

The *GC* trace is described in the text (Figure 1.b. and Table 3).

From 41 mg of the steryl acetate mixture of *Zoanthus* sp (obtained in the usual conditions), we isolated as described earlier (12), five fractions: S-1 (2 mg), a mixture of S-1/S-2 and S-3 (10 mg), S-4 (15 mg), S-5 (4 mg) and S-6 (5 mg).

S-1 (as the acetate) : *RRT* = 1.00, 83% pure by GC, co-chromatographs with an authentic sample of acetyl-cholesterol; *MS* : $M^{\cdot +}$— 60 = 368, 353 (368 — CH_3),...

S-1 / *S-2* / *S-3* (as the acetates) : *RRT* = 1.00 / 1.25 and 1.46 respectively, relative proportions of 73 / 17 and 10%; S-1 co-chromatographs with acetyl-cholesterol and S-2 with an authentic sample of (24S)-24-methylcholesterol (IV with the methyl β oriented). *MS* of the mixture : M_1^+— 60 = 368 (S-1), M_2^+— 60 = 382 (S-2) and M_3^+— 60 = 396 (S-3).

S-4 (as the acetate) : *RRT* = 1.12, over 94% pure, co-chromatographs with an authentic sample of brassicasteryl acetate ; *m.p.* : 150.5-152.0° (lit. 152°, ref 9) ; $[\alpha]_D$ = —55.9° (c = 1.12 in $CHCl_3$) (lit. —62.2°, ref. 9) ; *MS* : $M^{\cdot +}$— 60 = 380 (32, $C_{30}H_{48}O_2$ — AcOH), 365 (6, 380 — CH_3), 337 (6, 380 — C_3H_7), 296 (2), 282 (5), 267 (3), 255 (37, 380 — side chain), 253 (8, 380 — side chain + 2H), 239 (3), 228 (6), 213 (10, 380 — side chain and 42) ; *IR* : 1720, 1255. 1035 and 980 cm^{-1}.

S-5 (as the acetate) : *RRT* = 0.96, over 96% pure, co-chromatographs with and authentic sample of 22(E)-22-dehydrocholesteryl acetate; *MS* : $M^{\cdot +}$— 60 = 366 (17, $C_{29}H_{46}O_2$ — AcOH), 351 (2.5, 366 — CH_3), 323 (1, 366 — C_3H_7), (295 (1), 255 (15, 366 — side chain), 253 (2.5, 366 — side chain + 2H), 228 (2), 213 (4, 366 — side chain and 42).

TABLE 3

GC analysis of free sterol mixtures from some *Zoanthus* spp

RRT / SAMPLE	0.66	0.96	1.00	1.12	1.25	1.27	1.39	1.46	1.64	C (28)
Z. soc.	t	—	3	—	—	87	8	—	t	87
Z. sp	—	34		51	14		—	1	—	65
Z. pag. *	—	—	19	41	30	10	—	—	—	81
Z. prot. **	—	—	—	—	—	100	—	—	—	100
Z. soc. (Al) §	—	t	35	—	—	—	—	—	—	t

Z. soc. = *Z. sociatus*; *Z. pac.* = *Z. pacificus*; *Z. prot.* = *Z. proteus*; (Al) = alga

* after GUPTA & SCHEUER Steroids *13*:343 (1969)

** after BERGMANN *et al.* J. Org. Chem, *16*:1337 (1951)

§ after KOKKE *et al.* Tet. Letters 3601 (1979)

S-6 (as the acetate) : *RRT* = 1.27, over 99% pure, co-chromatographs with an authentic sample of chalinasteryl acetate ; *MS* : $M^{\cdot +}$ — 60 = 380 (27, $C_{30}H_{48}O_2$ — AcOH), 365 (8, 380 — CH_3), 296 (15, 380 — C_6H_{12}, *i.e.* Mac Lafferty rearrangement of a $\Delta^{24(28)}$ double bond), 281 (296 — CH_3), 272 (2), 259 (5), 255 (6, 380 — side chain), 253 (9, 380 — side chain + 2H), 228 (5), 213 (10) ; *IR* : 1720, 1640, 1260 and 895 cm^{-1}.

RESULTS

The GC traces of the sterol mixtures from the two *Zoanthus* species are compared in Figure 1 with the one reported for *Zoanthus confertus* (now named *Z. pacificus* Walsh & Bowers 1971 (20)). Calculated data appear in Table 3, where retention times are relative to cholesterol and where compositions (%) are deduced from the area of the GC peaks.

The three major sterols produced by *Z. sociatus* were isolated and identified as cholesterol (Z-1, I), chalinasterol (or 24-methylenecholesterol, Z-2, V) and zoanthosterol (4α-methyl-5α-ergosta-24(28)-en-3β-ol, Z-3, XI) by gas chromatographic, physico-chemical and spectroscopic data (12).

GC analysis of the sterol mixture obtained from the unidentified *Zoanthus* species (Fig. 1.b.) showed it to be more complex than that of *Z. sociatus*. The MS of the sterol fraction displayed at least five molecular ions at m/e = 414, 400, 398, 386 and 384. The characteristic fragment ion at m/e = 314 was indicative of the presence of a sterol with an exomethylene group at C-24 (Mac Lafferty rearrangement of a $\Delta^{24(28)}$ double bond) (9). Separation of the sterols, as their acetates, by argentic silica gel column chromatography, afforded four steryl acetates over 92% pure (by GC) and a mixture of three steryl acetates. The retention times relative to cholesteryl acetate were : 1.00 (S-1, 2 mg), 1.00-1.25-1.46 (S-1, S-2 and S-3, 10 mg), 1.12 (S-4, 15 mg), 0.96 (S-5, 4 mg) and 1.27 (S-6, 5 mg).

S-1 was identified as cholesteryl acetate with which it co-chromatographs in GC, on the basis of its retention time (GC) and of its MS identical with that of an authentic sample.

S-2 and *S-3* were tentatively identified as 24ξ-methyl and 24ξ-ethylcholesteryl acetates by their RRT identical with published data obtained in similar operating conditions (14). The MS of the mixture S-1/S-2/S-3 showed fragmentations ($M^{\cdot +}$ — 60) at m/e = 368 (*i.e.* parent sterol $C_{27}H_{46}O$), 382 (*i.e.* parent sterol $C_{28}H_{48}O$) and 396 (*i.e.* parent sterol $C_{29}H_{50}O$) which were in perfect agreement with our assumption. The absence of molecular ions strongly suggested a 3β-OAc-Δ^5 moiety (17). That the extra-carbon(s) of S-2 and S-3 were located in the side chain came from their MS showing fragment ions corresponding to the tetracyclic nucleus at the same m/e ratios as in cholesteryl acetate. In addition, S-2 co-chromatographed with an authentic sample of 22,23-dihydrobrassicasteryl acetate (IV with the methyl β oriented), suggesting the extra--carbon of S-2 to be located at C-24, the biogenetic favoured position.

KELECOM, A. & SOLÉ CAVA, A. M. Studies of brazilian marine invertebrates. IX*. Comparative study of Zoanthid sterols 1. The genus *Zoanthus*. *Mem. Inst. Butantan*, 44/45:451-462, 1980/81.

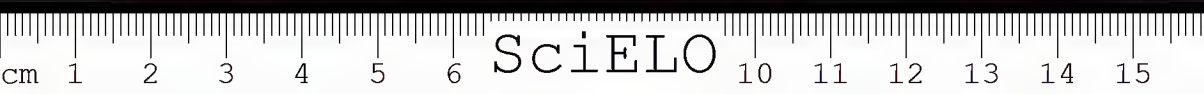



Fig. 1 — GC traces of sterol mixtures from *Zoanthus* spp *.

* after GUPTA e SCHEUER (9): reconstructed; in the original paper the zoanthid is named *Z. confertus*

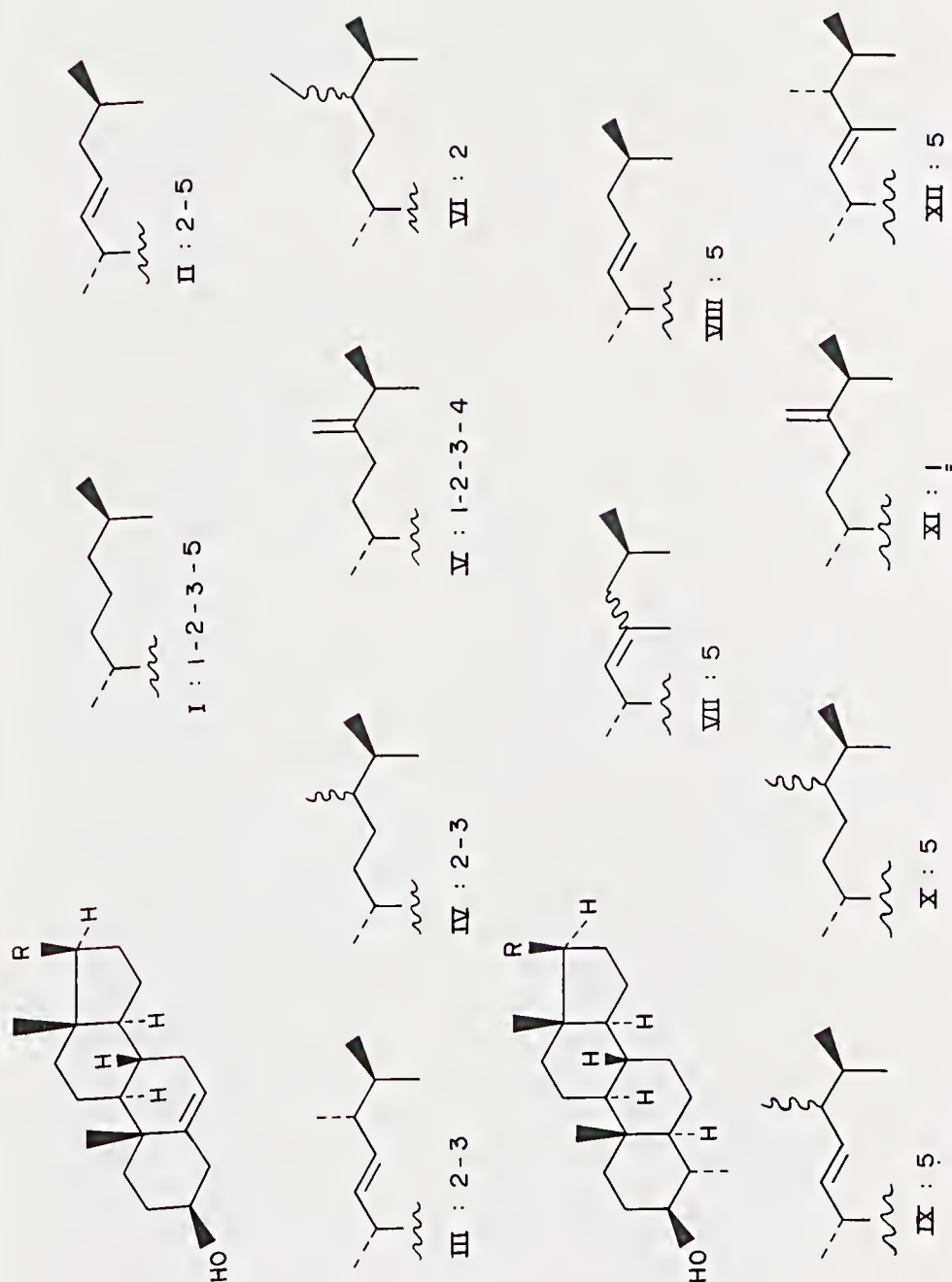



Fig. 2 — Sterol structures: Distribution of sterols in *Zoanthus* spp. 1 = *Z. sociatus*; 2 = *Zoanthus* sp; 3 = *Z. pacificus*; 4 = *Z. proteus*; 5 = symbiotic alga of *Z. sociatus*.

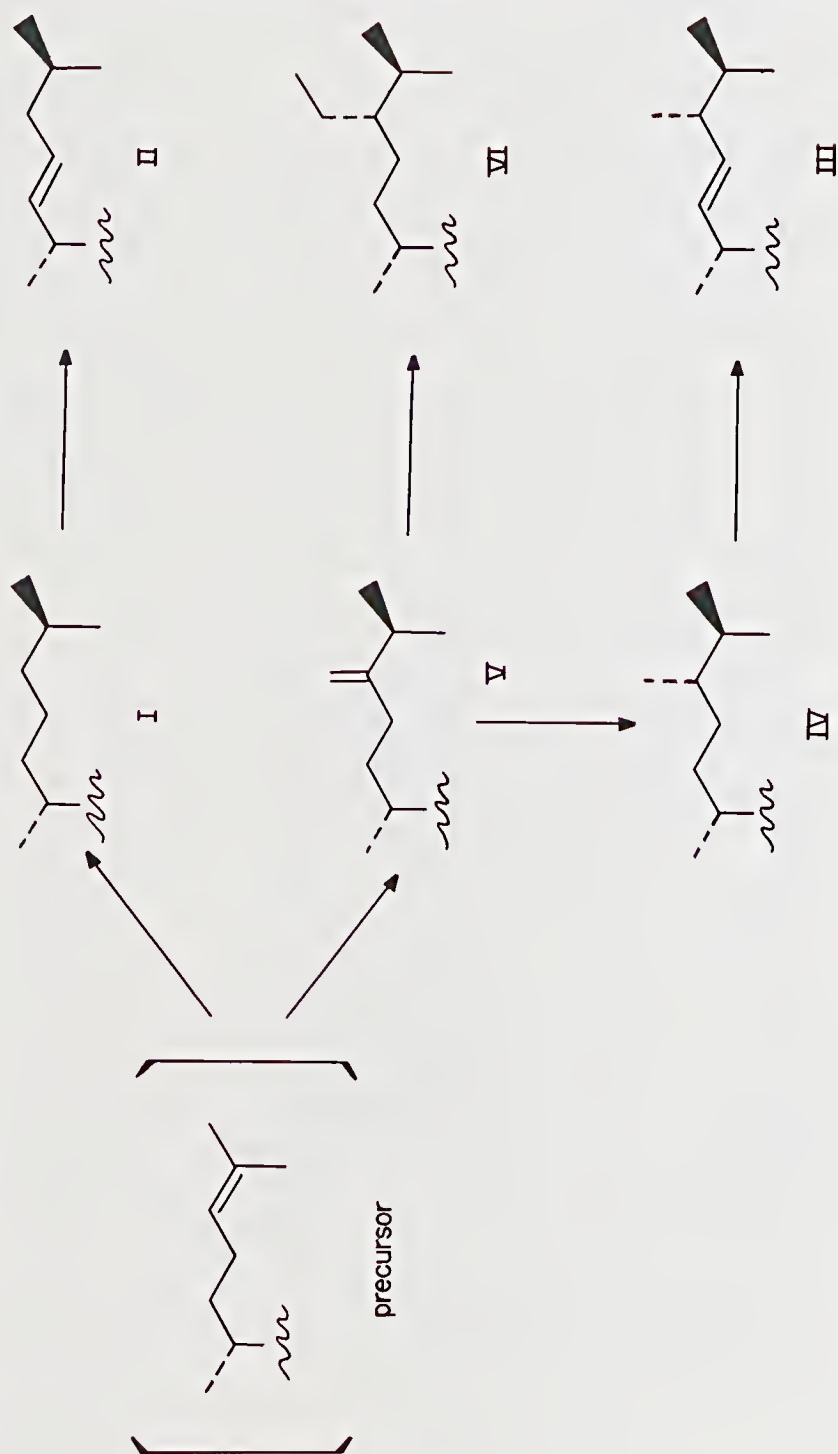



Fig. 3 — Sterols of *Zoanthus* sp, biosynthetic pathway

S-4 was identical with brassicasteryl acetate (9) by m.p., $[\alpha]_D$, IR, MS and GC (RRT and co-injection with an authentic sample).

S-5 was found identical with 22(E)-22-dehydrocholesteryl acetate by MS and GC (RRT and co-injection with an authentic sample).

S-6 was identified with chalinasteryl acetate (24-methylenecholesteryl acetate) by MS, IR and GC (RRT and co-injection with an authentic sample).

DISCUSSION

Although our knowledge on zoanthid sterols of the genus *Zoanthus* is restricted to only two published papers (5, 9) dealing with two species, some general conclusions appear.

1. C_{28}-sterols are the major sterols of *Zoanthus* species as they are of the class Anthozoa in general (11).

2. All the *Zoanthus* species studied up to now contain chalinasterol (V). It is the sole sterol of *Z. proteus*, the major one of *Z. sociatus* and a minor component of. *Z. pacificus* and of the unidentified *Zoanthus* species.

3. Cholesterol (I), a typical animal sterol, and brassicasterol (III), widely distributed in marine invertebrates (8), seem to be common sterols in *Zoanthus* species.

4. As *Z. proteus* is now considered synonimous with *Z. sociatus* (19), it is possible that the presence of small amounts of cholesterol (I) and zoanthosterol (XI) in the sterol fraction isolated by BERGMANN *et al.* (5) could not be detected by these authors due to the low performance analytical techniques existing prior to 1960.

5. The sterol composition of the unidentified *Zoanthus* species was found quite similar to that reported by GUPTA & SCHEUER (9) for *Z. pacificus* with, in addition to the reported cholesterol (I), brassicasterol (III), chalinasterol (V) and 24ξ-methylcholesterol (IV), the common (8) marine sterol 22(E)-22-dehydrocholesterol (II) and probably 24ξ -ethylcholesterol (VI). Considering the biosynthetic pathway shown in Fig. 3, the presence of brassicasterol (III) together with S-2 and S-3 allows us to suggest for the two latter sterols absolute configuration "24S", *i.e.* the alkyl at C-24 is probably β.

6. *Z. sociatus* was found to contain the rare zoanthosterol (XI), a new 4α-methyl-5α-stanol (12). Sterols containing a 4α-methyl-5α-stanol moiety have been obtained from various marine organisms including a red alga (4), a sea star (18) and an alcyonarian (6) but are most frequently encountered in free living dinoflagellates (1, 2, 3, 21 and 22). As zoanthids contain large amounts of symbiotic dinoflagellate algae known as zooxanthellae, it is tempting to speculate about the algal origin of zoanthosterol (XI). Indeed, the cultured alga isolated from the Jamaican *Z. sociatus* furnished, together with the Δ^5 sterols I and II, a series of 4α-methyl-5α-stanols (VII, VIII, IX, X, and XII) (13). But when about 96% of the sterol mixture of the Brazilian *Z. sociatus* is composed of sterols with a $\Delta^{24(28)}$ double bond, such compounds are completely

absent from the sterol fraction produced by the cultured alga of the Jamaican zoanthid (13). As we already pointed out (12), this may indicate biotransformations by the zoanthid of an algal precursor, a modification of the algal metabolism when separated from the zoanthid host or different geographic strains of symbiotic algae. Such local variations have been reported (16) for the symbiotic algae isolated from the zoanthids *Palythoa mammilosa* and *Protopalythoa grandis,* both collected in the Bermudas and in Jamaica.

7. The fact that only *Z. sociatus* contains 4α-methyl stanols, probably of algal origin, raises intriguing biological questions concerning the associated zooxanthella. From the four *Zoanthus* species investigated by SCHOENBERG & TRENCH (16), *i.c. Z. dubius, Z. pulchellus, Z. sociatus* and *Z.* sp, only *Z. sociatus* yielded a viable culture of the zooxanthella *Symbiodinium microadriaticum,* which furnished sterols VII, VIII, IX, X and XII (13). Biological and/or chemical comparison of this associated alga with the cultured zooxanthella from another *Zoanthus* species is thus presently impossible. But it was observed that the strain of zooxanthella isolated from *Z. sociatus* showed very low affinity with the associated algae of any other marine invertebrate, even with symbiotic algae strains obtained from zoanthids of the genera *Palythoa* and *Protopalythoa* (16). Whether this observation might explain the occurrence of 4α-methyl-5α-stanols only in *Z. sociatus* and in its associated symbiotic alga is still questionable.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are gratefull to Prof. P.M. BAKER (Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BRAZIL) for recording the mass spectra, to Prof. B. TURSCH (Collectif de Bio-écologie, Université Libre de Bruxelles, BELGIUM) and Prof. R.K. TRENCH (Marine Science Institute, University of California, Santa Barbara, CA, USA) for helpfull discussions about some aspects of the symbiosis between zoanthids and algae, and to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO: Estudos de Invertebrados Brasileiros do Mar. IX. Estudo Comparativo de Esteróis de Zoantídeos 1. O gênero *Zoanthus*. A composição em esterois de duas espécies de *Zoanthus* foi analisada e comparada com resultados da literatura Zoanthosterol (4α-metila-5α-ergosta-24(28)-eno-3β-ol), um novo esterol do mar, foi obtido a partir de *Z. sociatus*. Implicações biológicas são discutidas.

PALAVRAS-CHAVE: zoantídeos *, *Zoanthus* sp, *Zoanthus sociatus*, composição em esterois *, colesterol, chalinasterol, brassicasterol, zoanthosterol *, zooxantela.

REFERENCES

1. ALAM, M., SCHRAM, K.H. & RAY, S.M. 24-demethyldinosterol: an unusual sterol from the dinoflagellate, *Gonyaulax diagenesis*. *Tetrahedron Letters* (38):3517-3518, 1978.

2. ALAM, M.; SANSING, T.B.; BUSBY, E.L.; MARTINIZ, D.R. & RAY, S.M. Dinoflagellate sterols 1: sterol composition of the dinoflagellates of *Gonyaulax* species. *Steroids 33*(2):197-203, 1979a.

3. ALAM, M.; MARTIN, G.E. & RAY, S.M. Dinoflagellate sterols 2: isolation and structure of 4-methylgorgostanol from the dinoflagellate *Glenodinium foliaccum. J. Org. Chem. 44*(24):4466-4467 1979b.

4. ANDING, C.; BRAND, R.D. & OURISSON, G. Sterol biosynthesis in *Euglena gracilis.* Sterol precursors in light-grown and dark-grown *Euglena gracilis. Eur. J. Biochem. 24*(2):259-263, 1971.

5. BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. & SWIFT, A.N. Contribution to the study of Marine Products. XXXI. Palysterol and other Lipid components of sea anemones. *J. Org. Chem. 16*(9):1337-1344, 1951.

6. BORTOLOTTO, M.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; TURSCH, B. & KARLSSON, R. Chemical Studies of Marine Invertebrates. XXIX. 4α-methyl-3β,8β-dihydroxy-5α-ergost-24(28)-en-23-one, a novel polyoxygenated sterol from the soft coral *Litophyton viridis* (Coelenterata, Octocorallia, Alcyonacea). *Steroids 30*(2):159-164, 1977.

7. CALGREN, O. Ceriantharia and Zoantharia. Great Barrier Reef Expedition (1928-1929). *Scient. Rep. 5*(5):177-207, 1 pl.

8. GOAD, L.J. The Sterols of Marine Invertebrates: Composition, Biosynthesis, and Metabolites in: P.J. SCHEUER ed. "Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives" vol. II, chap. 2, pp. 75-172, New York Acad. Press, 1978.

9. GUPTA, K.C. & SCHEUER, P.J. Zoanthid sterols. Steroids *13*(3):343-356, 1969.

10. HERBERTS, C. Etude systématique de quelques Zoanthaires tempérés et tropicaux. *Tethys Suppl. 3*:69-156, 1972.

11. KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.I. & ANDO, T. Sterols of Coelenterates. *Comp. Biochem. Physiol. 57*B(2):317-323, 1977.

12. KELECOM, A. Studies of Brazilian Marine Invertebrates. VIII. Zoanthosterol, a new sterol from the Zoanthid *Zoanthus sociatus* (Hexacorallia, Zoanthidea). *Bull. Soc. Chim. Belges 90*, in press, 1981.

13. KOKKE, W.C.M.C.; WITHERS, N.W.; MASSEY, I.J.; FENICAL, W. & DJERASSI. C. Isolation and synthesis of 23-methyl-22-dehydrocholesterol — a Marine sterol of Biosynthetic significance. *Tetrahedron Letters* (38):3601-3604, 1979.

14. POPOV, S., CARLSON, R.M.K., WEGMANN, A. & DJERASSI, C. Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates 1. General methods of analysis. *Steroids 28*(5):699-732, 1976.

15. SCHMITZ, F.J. Uncommon Marine Sterols in P.J. SCHEUER ed. "Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives" vol. I, chap. 5, pp. 241-297. New York, Acad. Press, 1978.

16. SCHOENBERG, D.A. & TRENCH, R.K. Genetic variation in *Symbiodinium* (=*Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I. Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microadriaticum. Proc. R. Soc. Lond. B207*:405-427, 1980.

17. SHEIKH, Y.M. & DJERASSI, C. Steroids from Sponges. *Tetrahedron 30*(2): 4095-4103, 1974.

18. SMITH, A.G.; RUBINSTEIN, I. & GOAD, L.J. Sterols of the echinoderm *Asterias rubens. Biochem. J. 135*(3):443-455, 1973.

19. WALSH, G.E. An anotated Bibliography of the families Zoanthidae, Epizoanthidae, and Parazoanthidae (Coelenterata, Zoantharia). *Hawaii Inst. Mar. Biol.*, Technical Rep. n.º 13:1-77, 1967.

20. WALSH, G.E. & BOWERS, R.L. A review of Hawaiian Zoanthids with description of three new species. *Zool. J. Linn. Soc. 50*:161-188, 1971.

21. WITHERS, N.W.; TUTTLE, R.C.; HOLZ, G.G.; BEACH, D.H.; GOAD, L.J. & GOODWIN, T.W. Dehydrodinosterol, dinosterone and related sterols of a non-photosynthetic dinoflagellate, *Crypthecodinium cohnii*. *Phytochemistry 17*(11):1987-1989, 1978.

22. WITHERS, N.W.; GOAD, L.J. & GOODWIN, T.W. A new sterol, 4α-methyl-5α-ergosta-8(14),24(28)-dien-3β-ol, from the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Phytochemistry 18*(5):899-901, 1979.

Mem. Inst. Butantan
44/45:463-464, 1980/81

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

Mem. Inst. Butantan
44/45:465-470, 1980/81

ÍNDICE DE ASSUNTOS

Mem. Inst. Butantan
44/45:471-476, 1980/81

SUBJECT INDEX